

Alters-abhängige, kardiale Adaptation an Diät-induzierte Lipidüberlast
in Wildtyp-Mäusen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Aurich, Anne-Cathleen
aus Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Gießen 2015

Aus dem Physiologischen Institut des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Susanne Rohrbach

Gutachter: PD Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation: 26.07.2016

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	i
2	Einleitung	1
	2.1 Mitochondrien.....	2
	2.2 Herzstoffwechsel.....	4
	2.2.1 Der Herzstoffwechsel und seine Substrate	4
	2.2.2 Die Regulation des Herzstoffwechsels	6
	2.2.3 Der veränderte Herzstoffwechsel	7
	2.2.4 Tiermodelle.....	9
	2.3 Herzinsuffizienz	10
	2.4 Altersherz (Charakteristika)	11
	2.4.1 Veränderung an Myozyten	12
	2.4.2 Stoffwechsel	13
	2.5 Zielstellung der Arbeit	14
3	Material und Methoden	17
	3.1 Material.....	17
	3.1.1 Chemikalien allgemein	17
	3.1.2 Chemikalien Zellkultur	19
	3.1.3 Testsubstanzen / Fettsäuren.....	19
	3.1.4 Molekulargewichtsmarker	19
	3.1.5 Enzyme	20
	3.1.6 Kits / Färbereagenzien / sonstiges	20
	3.1.7 Geräte	21
	3.2 Molekularbiologische Methoden	22
	3.2.1 Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen	22
	3.2.1.1 Gewebe	22
	3.2.1.2 Zellen.....	22
	3.2.2 cDNA Synthese (Reverse Transkription – RT-PCR)	22
	3.2.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction – PCR).....	23
	3.2.4 Klonierung von DNA.....	25
	3.2.4.1 Klonierung alpha2AMPK	25
	3.2.5 Vektoren	26
	3.2.5.1 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli Zellen	26
	3.2.5.2 Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	27
	3.2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA (DNA-Minipräparation / Midipräparation)	27
	3.2.6 Isolation von Proteinen aus Gewebe	28
	3.2.6.1 Gewebe	28
	3.2.6.2 Zellen.....	29
	3.2.7 Proteinanalyse.....	29
	3.2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoreses (SDS-PAGE)	29
	3.2.7.2 Western-Blotting und Antikörperfärbung.....	30
	3.2.8 Bestimmung von Fettsäure- und Triglycerid-Gehalt	31
	3.2.9 Bestimmung des Serumgehaltes von Adiponektin, Leptin und Insulin	32
	3.2.9.1 Adiponektin-ELISA	32
	3.2.9.2 Insulin-ELISA.....	32
	3.2.9.3 Leptin-ELISA	32
	3.3 Tiermodell im Versuch.....	32
	3.3.1 Mausstamm	33
	3.3.2 Einfluss fettreicher Nahrung.....	33
	3.3.3 Untersuchung der kardialen Funktion mittels transthorakaler Echokardiographie	34
	3.3.3.1 Methoden der Echokardiographie	34
	3.3.4 Histologie.....	36

3.3.4.1	Färbung von Fetteinlagerungen im Herzgewebe	36
3.3.4.2	Zellmembran-Färbung von Kardiomyozyten mit Lectin	37
3.3.4.3	Kollagen-Färbung von Kardiomyozyten mit Siriusrot nach Puchtler	37
3.3.5	Messung der Aktivität der Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase (Medium Chain Acyl CoA Dehydrogenase – MCAD).....	37
3.4	Zellkultur	38
3.4.1	Zelllinien	38
3.4.2	Kultivierung und Passagieren der Zelllinien	38
3.4.3	Transfektion von HEK 293 und TRex HeLa	38
3.4.4	Behandlung von HEK 293 und TRex HeLa mit Fettsäuren	39
3.5	Statistische Auswertungen	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Einfluss Fütterung fettreicher Nahrung auf Körper- und Organgewicht.....	40
4.2	Nachweis der Triglyceride und freien Fettsäuren.....	44
4.3	Charakterisierung der ventrikulären Funktion	47
4.3.1	Bestimmung der zellulären Hypertrophie (cross sectional area)	52
4.4	Stoffwechselanalyse	53
4.4.1	Peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α) – Target-Gene	54
4.4.1.1	Acyl-CoA-Thioesterasen	56
4.4.1.2	Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels.....	57
4.4.1.3	Ergebnisse der MCAD-Aktivität-Messung.....	58
4.4.1.4	Stearoyl-CoA-Desaturase	58
4.4.2	Adiponektin-vermittelte AMPK-Aktivierung	59
4.4.2.1	Untersuchung des Serums.....	59
4.4.2.2	Expressionsanalysen von Adiponektin im Fettgewebe	61
4.4.2.3	Adiponektin-Rezeptoren.....	61
4.4.2.4	Expression der Adiponektinparaloge C1q/TNFA-related proteins (CTRP)	62
4.4.2.5	Expressionsanalysen von AMP-aktivierter Protein-Kinase (AMPK)	63
4.4.2.6	Charakterisierung des Aktivierungszustandes der AMPK	64
4.4.3	Mitochondriale Funktion und Biogenese	65
4.4.3.1	Expressionsanalysen Atmungskettenkomplexe.....	66
4.5	Fettsäurebehandlung von HEK293 Zellen	69
4.5.1	Fettsäure-Behandlung untransfizierter HEK293-Zellen	70
4.5.1.1	Behandlung untransfizierter Zellen mit Palmitat	70
4.5.1.2	Behandlung untransfizierter Zellen mit Oleat	70
4.5.1.3	Behandlung untransfizierter Zellen mit DHA.....	71
4.5.2	Fettsäure-Behandlung transfizierter (a2AMPK-überexprimierender)- HEK293-Zellen.....	72
4.5.2.1	Behandlung transfizierter Zellen mit Palmitat	72
4.5.2.2	Behandlung transfizierter Zellen mit Oleat	73
4.5.2.3	Behandlung transfizierter Zellen mit einer Kombination von Oleat und Palmitat	74
5	Diskussion.....	76
5.1	Tierversuch	77
5.1.1	Einfluss Fütterung fettreicher Nahrung auf Körper- und Organgewicht.....	77
5.1.1.1	Körper- und Organgewichte	77
5.1.1.2	Lipideinlagerung und Analyse der Serum-Triglycerid- und Fettsäurespiegel	78
5.1.2	Charakterisierung der ventrikulären Funktion	79
5.1.3	Stoffwechselanalyse.....	81
5.1.3.1	PPAR α und seine Target-Gene.....	81
5.1.3.2	ACO, ACC2 und MCAD – Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels	83
5.1.3.3	SCD1, SCD4	84
5.1.4	Adiponektin-vermittelte AMPK-Aktivierung	85
5.1.4.1	Expressionsanalysen und Charakterisierung der Aktivierungszustandes der AMPK	88

5.1.5	Mitochondriale Biogenese und Funktion	89
5.2	Zellversuche	90
5.3	Schlussfolgerung	93
6	Zusammenfassung	95
7	Summary	96
8	Abkürzungsverzeichnis	97
9	Abbildungsverzeichnis	100
10	Tabellenverzeichnis	102
11	Literaturverzeichnis	103
12	Anhang	115
12.1	Diäten.....	116
12.1.1	Low Fat Diät und High Fat Diät	116
12.1.2	Kontroll-Diät.....	117
12.2	Publikationen	118
12.3	Abstract	118
12.4	Erklärung	119
12.5	Danksagung	120

2 Einleitung

Alterung. Wie genau definiert man diesen Begriff? Man findet verschiedenste Formulierungen und doch gibt es keine allgemein verbindliche Definition in der wissenschaftlichen Literatur. Alle Aussagen zu diesem Thema vereinen und zeigen, dass das Altern ein individueller Vorgang ist, der den verschiedensten biologischen Prozessen und Regulationen unterliegt. Das biologische Alter des Menschen ist primär genetisch verankert und wird auf maximal 130 Jahre geschätzt. Sekundäre Faktoren, wie z. B. Umwelt, Ernährung, Lebensstil, Aktivität und Krankheiten, wirken zudem auf diesen biologischen Prozess. Sehr gut analysiert am Alterungsprozess sind der Einfluss und die Wirkung freier Radikale (ROS) im Organismus, die beständig während des Stoffwechsels gebildet werden und eine stetig ansteigende Konzentration mit zunehmendem Alter aufweisen. Die sogenannte „Theorie der freien Radikale“ wurde im Laufe der Zeit verfeinert, da es sich herausstellte, dass Mitochondrien gleichzeitig Quelle und Wirkungsort der ROS darstellen (Meissner 2007). Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies führen zu Schädigungen an DNA, Proteinen, Kohlenhydraten oder Membranlipiden was starke funktionelle Veränderungen zur Folge hat. Verschiedenste Reparaturmechanismen in der Zelle sind ständig im Einsatz, um den entstehenden Schaden an den Zellen so gering wie möglich zu halten. Dennoch kann man mit zunehmendem Alter in den „Kraftwerken“ der Zelle des Organismus einen Anstieg von Defekten beobachten, die auf Dauer nicht ausgeglichen werden können. Zelluläre Dysfunktion bis hin zur Apoptose ist die Folge. Gewebe, welche wie das Herz einen hohen Sauerstoffumsatz haben und somit eine hohe Mitochondriendichte aufweisen, sind daher besonders gefährdet für oxidative Schäden. Folgen der oxidativen Schäden im alternden Gewebe sind beispielsweise eine verminderte Fähigkeit der ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung. Dabei stellt nicht der verringerte Mitochondriengehalt mit zunehmendem Alter, sondern eine selektive Verminderung der Aktivität der Komplexe I und IV der Atmungskette eine Ursache der Dysfunktion dar (Kumaran et al. 2004). Dysfunktionelle Mitochondrien charakterisiert neben einem verringerten Membranpotential, ein erhöhter Gehalt an oxidativ veränderten Phospholipiden, Proteinen und DNA, was wiederum zu einer Vergrößerung und erhöhten Fragilität der Organellen führt (Navarro and Boveris 2007). Die Theorie der mitochondrialen Alterung berücksichtigt, dass Mitochondrien Hauptproduzenten von Oxidantien sind (Tsutsui et al. 2011) und stellt eine Erweiterung der „free radical theorie of aging“ dar. Da mitochondrialer DNA schützende Histonkomplexe fehlen und nur eine geringe Reparaturaktivität nachgewiesen wurde (Bohr 2002), ist sie durch die unmittelbare Nähe zur ROS-Quelle besonders durch oxidative Schädigung gefährdet.

Mutationen der mitochondrialen DNA, welche für 13 Polypeptide der Atmungskette kodiert, können zu einer veränderten Kopplung des Elektronentransports und Änderungen der ATP-Produktion führen. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Produktion an Radikalen und somit zu einem Kreislauf ansteigender mitochondrialer Dysfunktion und oxidativer Schädigung mit zunehmendem Alter (Hagen et al. 2002; Lenaz et al. 2002).

In verschiedensten Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass kalorische Restriktion, verstärkte neurologische Aktivität und moderate körperliche Betätigung der mitochondrialen Dysfunktion in gealtertem Leber- und Gehirngewebe entgegenwirken (Navarro and Boveris 2007). Kalorische Restriktion wirkt sich jedoch auch positiv auf stark von apoptotischen Veränderungen gezeichnete mitochondrienreiche Gewebe, wie Herz- und Skelettmuskel, aus (Hepple et al. 2006). Einerseits werden ROS-verursachte endogene DNA Schäden (Barja 2002) sowie oxidativ veränderte Proteine durch Reaktivierung von Peroxisomen nach nur 2-monatiger kalorischer Restriktion seneszenten Nager reduziert (Takahashi and Goto 2002). Andererseits wirkt sich die Expressionsinduktion antiapoptotischer Gene (Rohrbach et al. 2006) und die Aktivierung mitochondrialer Biogenese (Nisoli et al. 2003; Nisoli et al. 2004; Nisoli et al. 2005) unter kalorischer Restriktion zusätzlich positiv auf Gewebestruktur und –funktion aus. Kalorische Restriktion ist auch die einzige Möglichkeit, nachweislich die Lebensspanne zu verlängern und die oxidativen Schäden zu verringern (Walsh et al. 2014)

2.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene Zellorganellen und werden als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet (Abb. 2-1 A). Die äußere Membran ist durchlässig für kleine Moleküle und Ionen, welche durch Transmembrankanäle (Porine) ins Innere gelangen. Spannungsabhängige Anionen-Kanäle erlauben den Metabolitaustausch zwischen Mitochondrien und Cytosol. (Navarro and Boveris 2007). Über energieabhängige Transporter werden Moleküle und Ionen über die innere Membran in die Mitochondrien transportiert. Für Protonen ist die innere Membran dagegen durchlässig, was die Grundlage für die mitochondriale Energietransduktion bildet.

Die mitochondriale Energietransduktion bzw. oxidative Phosphorylierung beschreibt einen schrittweisen Transport von anfangs Wasserstoff und später von Elektronen über die Atmungskettenkomplexe I-IV (Abb. 2-1 B). Die Elektronen werden über den Komplex I in Form von NADH in die Atmungskette eingeschleust. Daraufhin werden diese schrittweise transportiert und dabei die Redoxenergie stufenweise vermindert,

was zur Entstehung eines Protonengradienten führt. Dieser bildet die Grundlage für die ATP-Synthese. Wasser entsteht als Nebenprodukt durch Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff.

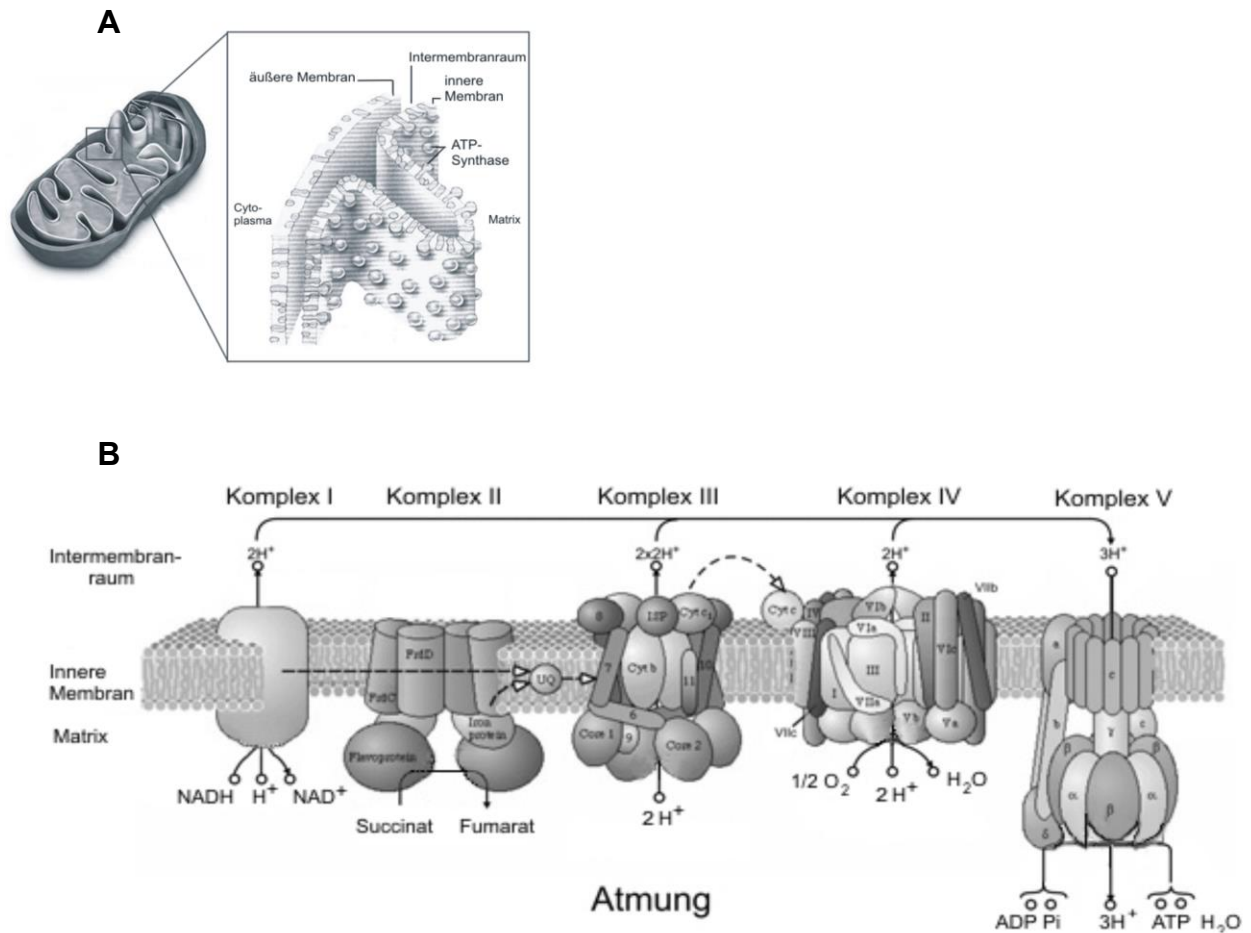


Abbildung 2-1 Mitochondrien - Kraftwerke der Zelle: A – Mitochondrium innere und äußere Membran (Abb. verändert; Quellen: <http://www.zytologie-online.net/mitochondrium.php>; <http://www.rhinobeam.ch>); B - schematische Darstellung der Atmungskette (Abb. verändert nach (Bundy et al. 2008))

Neben dieser wichtigen biochemischen Funktion der Energiebereitstellung findet in den Mitochondrien der Abbau von Fettsäuren (β -Oxidation) und Pyruvat (Citratzyklus) statt. Des Weiteren sind sie beteiligt am programmierten Zelltod und fungieren aufgrund ihrer Fähigkeit, Calcium-Ionen aufzunehmen und abzugeben, als Kalzium-Speicher und greifen in die Kalzium-Homöostase der Zellen ein. Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom (Chondriom), lokalisiert in der mitochondrialen Matrix. Es besitzt in den meisten Säugern eine durchschnittliche Größe von 16 kb und codiert für etwa 1% der gesamten genetischen Information beim Menschen, wobei 37 Gene die Synthese von 13 Proteinen kodieren. Das Chondriom enthält Gene, die für die Produktion der rRNAs

und tRNAs verwendet werden und codiert einen Teil der für die Funktionsfähigkeit der Atmungskette notwendigen Proteine. Beim Menschen kontrollieren 37 mitochondriale Gene die Synthese von ca. 13 der 80 Proteinuntereinheiten der Komplexe I, III, IV und V der Atmungskette. Komplex II besteht ausschließlich aus kerncodierten Proteinen. Die Koordination der Kern- und mtDNA-Expression wird in Säuger-Zellen vorwiegend durch den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (mtTFA) vermittelt. Mit zunehmendem Alter zeigen Mitochondrien eine verminderte Genexpression, insbesondere Untereinheiten (z. B. Untereinheiten NADH und COX, cyt b, ATPase 6) der Komplexe I, III, IV und V der mitochondrialen Atmungskette (Manczak et al. 2005), was folglich zu einer sinkenden ATP-Produktion der Zelle führt (Wong et al. 2010).

Das Myokard stellt ein besonders mitochondrienreiches Gewebe dar, dass zwei biochemisch verschiedene Arten Mitochondrien aufweist (Rosca and Hoppel 2010). Unterschieden wird in die unter der Plasmamembran liegenden subsarkolemmalen (SSM) und die interfibrillären Mitochondrien (IFM), welche, in parallelen Reihen angeordnet, zwischen den Myofibrillen liegen (Rosca and Hoppel 2010). Die IFM lassen sich aufgrund einer erhöhten Citratsynthase- und Succinat-Dehydrogenase-Aktivität von den SSM biochemisch unterscheiden.

Das kardiale Gewebe, als ein mitochondrienreiches Gewebe, ist besonders betroffen von der schädigenden Wirkung reaktiver Stoffwechselprodukte. Neben Boveris und Chance identifizierten auch andere Arbeitsgruppen aus Herz und Leber isolierte Mitochondrien als aktive Quelle von H_2O_2 und NO (Richter et al. 1997; Giulivi et al. 1998).

2.2 Herzstoffwechsel

2.2.1 Der Herzstoffwechsel und seine Substrate

Das Myokard, bestehend aus regelmäßig angeordneten quergestreiften Muskelfasern, stellt mit seinem hohen Energiebedarf eines der mitochondrienreichsten Gewebe dar. Das adulte postnatale Säugerherz ist auf langkettige Fettsäuren als Hauptsubstrat für die ATP-Produktion angewiesen (Okere et al. 2006). Unter normalen Bedingungen sind die meisten der in die kardialen Myozyten transportierten Fettsäuren oxidiert, da die Speicherung von Fetten im Herz limitiert ist. 70-90% der eingeschleusten Fettsäuren werden der Fettsäureoxidation zugeführt (Stanley et al. 2005). Den Hauptanteil freier Fettsäuren bildet die im Blut reichlich vorkommende Ölsäure (Lopaschuk et al. 2010). Langkettige Fettsäuren werden mittels zweier Fettsäuretransporter in die Myozyten transportiert, FATP (fatty acid transport protein) und FAT (fatty acid translocase, CD36) (Brinkmann et al. 2002). Über CPT1 (Carnitine palmitoyltransferase 1) werden diese durch Transveresterung in den mitochondrialen Intermembranraum aktiv

eingeschleust. Eine Translokation mit Hilfe von Carnitin/Acylcarnitin-Translokasen durch die innere Mitochondrienmembran in die Matrix führt die Fettsäuren der Beta-Oxidation zu. Im normalen, nicht dysfunktionalen Herz wird bei einem Überangebot an Fettsäuren und Lipiden der Stoffwechsel auf eine verstärkte Fettsäureoxidation, bei gleichzeitiger Hemmung der Glucose-Oxidation, umgestellt (Hue and Taegtmeyer 2009).

Neben Fettsäuren werden im Myokard auch Glucose und Laktat verstoffwechselt. Glucose wird über spezifische Transporter in die Zelle eingeschleust, nach vorübergehendem Einbau in Glykogen sofort zu Pyruvat verstoffwechselt und vollständig verbrannt. Neben Glucose bzw. Pyruvat werden die in der Leber gebildeten Ketonkörper (Beta-Hydroxybutyrat u. Azetazetat) ebenfalls als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust und verstoffwechselt. Das gesunde, junge Herz ist dabei in der Lage den myokardialen Verbrauch entsprechend der Substrate anzupassen (Saks et al. 2006; Abel 2007).

Bei körperlicher Arbeit nutzt das Myokard als Hauptenergiequelle (zu 60%) das vermehrt im Skelettmuskel gebildete Laktat. Da Ketonkörper und angereichertes Laktat bei vermehrter Bildung und somit hoher Konzentration im Körper zu einer Hemmung der Glucose- und Fettsäure-Aufnahme in die Myozyten führen können, stellt die Verstoffwechselung im Myokard eine Art protektiven Mechanismus dar.

Im ruhenden Muskel dagegen werden die Substrate (Glucose, freie Fettsäuren, Laktat) meist zu etwa je 1/3 verstoffwechselt. Der Herzmuskel ist außerdem in der Lage je nach Substratangebot den Stoffwechsel entsprechend zu regulieren (Stanley et al. 2005). Damit wird deutlich, dass die Zusammensetzung der Nahrung offensichtlich einen großen Einfluss auf metabolische Änderungen der Kardiomyozyten besitzt. (Okere et al. 2006).

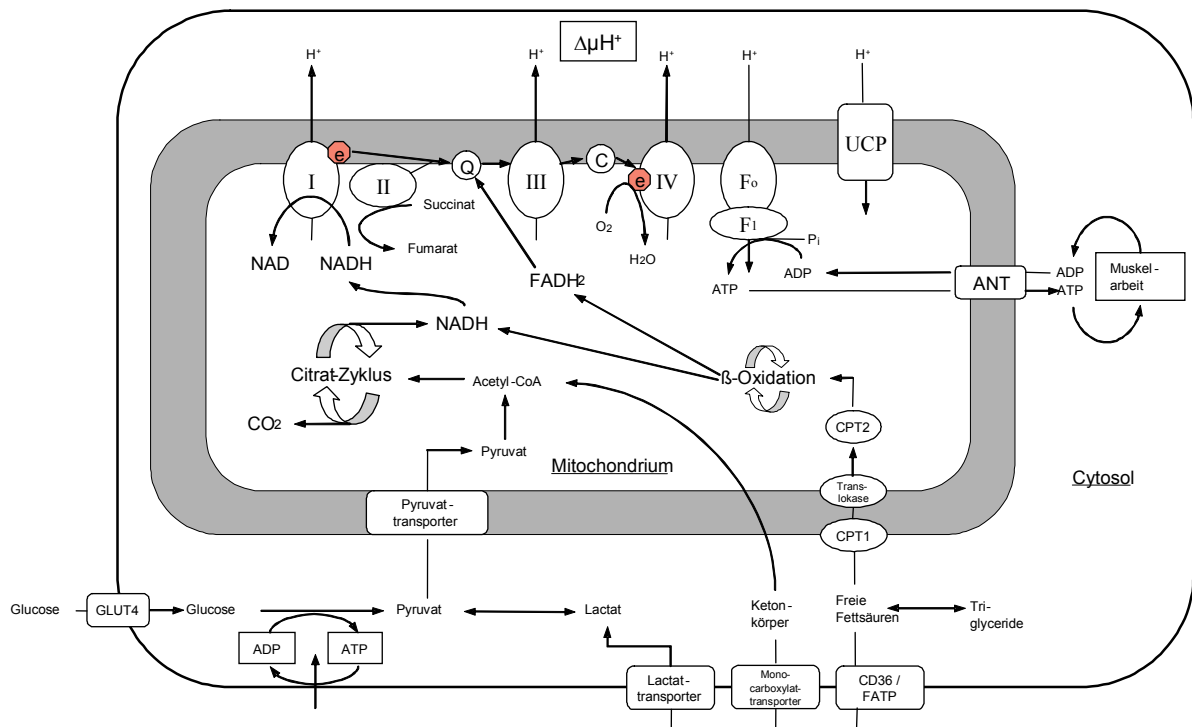


Abbildung 2-2 Übersicht myokardialer Stoffwechsel [Abb. nach (Murray et al. 2007), verändert]

Mit zunehmender Alterung des Myokards kommt es zur Umstellung auf eine vorrangig glykolytische Energiegewinnung (McMillin et al. 1993). Die fehlende Verstoffwechselung von Fettsäuren kann zu einem Überschuss dieser und einer Akkumulation in Form von Triglyceriden in verschiedensten Geweben führen.

2.2.2 Die Regulation des Herzstoffwechsels

Die Familie der Peroxisom-Proliferator-Aktivierten Rezeptoren (PPAR) und die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) stellen wichtige Sensoren im Herzstoffwechsel dar. Der vorwiegend im Herz exprimierte PPARalpha-Rezeptor wird durch Bindung langkettiger Fettsäuren aktiviert (Panagia et al. 2005). PPAR α bindet neben gesättigten auch langkettige ungesättigte Fettsäuren, sowie Eicosanoide und fungiert als Schalter für die Induktion verschiedener Signalkaskaden (Desvergne and Wahli 1999). Dies bewirkt eine Aktivierung der Expression verschiedener Schlüsseldene des Fettstoffwechsels, wie beispielsweise der o. g. Fettsäuretransporter, wodurch die Fett-

säuren vermehrt der β -Oxidation in den Mitochondrien zugeführt werden und so das Myokard vor Lipotoxischen Auswirkungen schützen (Barger and Kelly 2000).

PPAR α wurde in verschiedenen Knockout- und Überexpressionsstudien eine zentrale, regulierende Funktion in der Lipidhomöostase zugeschrieben. So zeigt die Überexpression von PPAR α eine gesteigerte Fettsäureaufnahme und -oxidation (Finck and Kelly 2002; Hopkins et al. 2003), sowie eine Erhöhung des mitochondrialen Elektronentransports, der oxidativen Phosphorylierung und eine verstärkte Expression von Genen der mitochondrialen Biogenese (Lehmann et al. 2000).

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) als zentraler Energiesensor (Kahn et al. 2005) fungiert dagegen als metabolischer Schalter zwischen Fett- und Glucosestoffwechsel in unterschiedlichen peripheren Geweben (Long and Zierath 2006). Neben der Aktivierung der Fettsäure-Oxidation, Glucose-Aufnahme, mitochondrialen Biogenese und Kontrolle der Insulinsensitivität im Skelettmuskel, wirkt die AMPK auch regulierend auf die Gluconeogenese, Lipogenese und Cholesterinsynthese im Lebergewebe sowie im Hypothalamus induzierend auf die Aufnahme von Nahrung (Long and Zierath 2006). Aktivatoren dieses Enzyms sind vorrangig hohe AMP-Konzentrationen (Minokoshi et al. 2002; Hardie et al. 2006)). In der Folge kann man allgemein von einer Hochregulation der katabolen (ATP-produzierenden) und einer Herabregulation der anabolen (ATP-verbrauchenden) Stoffwechselwege sprechen. Hohe Konzentrationen an ATP wiederum inhibieren die Aktivierung von AMPK (Long and Zierath 2006). Yamauchi et al. und Minokoshi et al. konnten außerdem den aktivierenden Einfluss von Adiponektin und Leptin auf die AMPK und einer damit verbundenen Induktion der Fettsäureoxidation und Glucose-Aufnahme im Skelettmuskel nachweisen (Minokoshi et al. 2002; Yamauchi et al. 2002). Wie Minokoshi et al. beschreiben, wirkt Leptin dabei einerseits direkt auf die AMPK und andererseits im Hypothalamus über alpha-adrenerge Mechanismen (Minokoshi et al. 2012).

Im weiteren Verlauf wird die Acyl-CoA-Carboxylase durch die aktivierte AMPK phosphoryliert und führt somit zur Hemmung der Synthese von Malonyl-CoA, was wiederum einen gesteigerten Fettsäureimport über CPT1 begünstigt und so die Fettsäuren zur Verstoffwechselung in die Mitochondrien schleust (Lane et al. 2008). Die Verringerung der MalonylCoA-Konzentration bewirkt zudem ein Anschalten der Fettsäure-Oxidation (Woods et al. 2000).

2.2.3 Der veränderte Herzstoffwechsel

Metabolische und strukturelle Veränderungen resultieren oft in kardialer Dysfunktion. So wiesen Christoffersen et al. einen Zusammenhang zwischen Lipidakkumulation und

diastolischer Dysfunktion bei Untersuchungen von *ob/ob*-Mäusen nach (Christoffersen et al. 2003) und Untersuchungen beim Menschen bestätigten, dass eine Lipidakkumulation im Myokard eine linksventrikuläre Hypertrophie und eine eingeschränkte Kammerkontraktilität zur Folge hat (Szczepaniak et al. 2003; Rijzewijk et al. 2008). Aus diesen Ergebnissen entstand die Theorie der Lipotoxizität bzw. der lipotoxischen Kardiomyopathie und rückte damit den Fettstoffwechsel in den Mittelpunkt des Interesses bezüglich der Aufklärung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die hierbei auftretende Akkumulation von Lipidtröpfchen (Intramyozelluläre Lipidtröpfchen - IMCL) in den Zellen und exzessive Speicherung von Fetten im Gewebe führt zu Zell-Dysfunktion und auch Zelltod (Unger and Orci 2001; Schaffer 2003). Diese, den gesamten Organismus betreffende Erkrankung wird auch als metabolisches Syndrom bezeichnet.

Folge davon ist, dass es zur Akkumulation von Fetten im Cytoplasma kommt, was normalerweise durch erhöhte Expression von Genen, die zur Verwertung der Fette wichtige Proteine und Enzyme codieren, kompensiert wird (Bishop-Bailey 2000). Die in diesem Zustand auftretenden hohen Konzentrationen an freien Fettsäuren im Zytoplasma führen zur Inhibierung der Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT1) und zur Hemmung des Fettsäureimports in die Mitochondrien (Rasmussen et al. 2002). Eine weitere Folge ist eine myokardiale Insulinresistenz, welche durch eine eingeschränkte metabolische Flexibilität gekennzeichnet ist und zum Aufbrauchen der Glykogenvorräte führt, was wiederum zu einer eingeschränkten Arbeitskapazität führen kann (Petersen and Shulman 2006; Delarue and Magnan 2007). Die aus der Verstoffwechselung der freigesetzten Glucose entstehenden Malonyl-CoA-Moleküle hemmen ebenfalls die CPT1. Damit wird der überwiegende Teil der Fettsäuren zu Triglyceriden verestert (Folmes and Lopaschuk 2007). Dieser lipotoxische Zustand wird zusätzlich über Mediatoren wie Ceramide, reaktive Sauerstoffmoleküle (ROS), Fettsäuren oder ein Adiponektindefizit verstärkt. Ceramide beispielsweise, gebildet aus überschüssigen gesättigten Fettsäuren, vermitteln durch Aktivierung proapoptotischer Caspasen zytotoxische Wirkungen im Myokard. Chiu et al. bezeichneten den Vorgang als fettsäureinduzierte Apoptose (Chiu et al. 2001) und Listenberger et al. bestätigten diesen Vorgang an isolierten neonatalen Kardiomyozyten mit Palmitat (Listenberger et al. 2003), welches von Okere et al. als Ausgangssubstrat der de-novo Synthese von Ceramiden identifiziert wurde (Okere et al. 2006). Okere et al. wiesen dies auch in Fütterungsversuchen von Ratten nach, wobei Sie zeigen konnten, dass eine Diät reich an Palmitat hohe Konzentrationen an Ceramiden im Herzmuskel zur Folge hat (Okere et al. 2006). Rennison et al. schlussfolgerten daraus, dass Lipidakkumulationen außerhalb des Fettgewebes und hohe zirkulierende Konzentrationen an Fettsäuren im

Plasma eine große Rolle bei der Ausbildung von Herzinsuffizienzen, Adipositas und Diabetes spielen (Rennison et al. 2008). Bereits Chiu et al. und Finck et al. führten die resultierende kardiale Dysfunktion auf vermutlich toxische Effekte der Lipideinlagerung oder auf Schädigungen durch freie Radikale zurück (Chiu et al. 2001; Finck and Kelly 2002). Auf all diese Vorgänge wirkt sich ein zusätzliches Adiponektindefizit negativ aus und kann letztendlich die Entstehung von Hypertrophie, Kardiomyopathien und systolischen Dysfunktionen durch direkten Einfluss der Kardiomyozyten bedingen (Goldstein et al. 2009).

Aber auch eine Aktivierung von PPAR α steht im Verdacht, kardiale Dysfunktionen zu verursachen. So zeigte eine Überexpression des herzspezifischen PPAR α in Mäusen unter Fütterung einer fettreichen Diät die Induktion kardialer Dysfunktion (Finck et al. 2003). Durch Bindung langkettiger Fettsäuren wird PPAR α aktiviert und führt zur intrazellulären Akkumulation von Lipiden (Finck and Kelly 2002), welche wiederum verstärkt zur Bildung reaktiver Oxygenspezies führen und somit myozytäre Hypertrophie und Dysfunktion gefördert werden (Finck et al. 2003). Folgen der PPAR α -Aktivierung sind außerdem eine Verminderung des Glucosestoffwechsels, sowie die Induktion der Expression von UCP2 und UCP3, welche eine mitochondriale Entkopplung verursachen (Young et al. 2001; Boudina et al. 2005; Okere et al. 2007). Neben den Tiermodellen deuten auch Studien mit Patienten auf eine Involvierung von PPAR α in Herzerkrankungen hin. So wiesen Schupp et al. in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie einen erhöhten Gehalt an PPAR α im linken Ventrikel nach (Schupp et al. 2006).

Neben den negativen Wirkungen der PPAR α -Überexpression zeigen aber auch Untersuchungen in PPAR α ^{-/-} - Mäusen sowie Patienten mit Herzerkrankungen (2000 Barger Kelly), dass eine Deaktivierung von PPAR α ebenfalls negative Auswirkungen hat. So konnte gezeigt werden, dass in PPAR α ^{-/-} - Mäusen Störungen im Redox-System, hinsichtlich einer Verminderung von Catalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion Peroxidase mit dem Ergebnis der Anreicherung von reaktiven Oxygen- und Nitrogenspezies, vorliegen (Lecarpentier et al. 2010). Gleichzeitig kommt es zu strukturellen Veränderungen des Myokards, gekennzeichnet durch kardiale Fibrose, abnormale Myofibrillen und Mitochondrien, sowie kardialer Hypertrophie (Lecarpentier et al. 2010).

2.2.4 Tiermodelle

Um metabolische Veränderungen im Myokard besser verstehen zu können, bedient sich die Forschung u. a. verschiedenster genetischer Adipositasmodelle (ob/ob-Maus,

db/db-Maus, Zucker-Diabetes-Ratten). Das Modell des diätinduzierten Typ-2-Diabetes, beschrieben erstmals von Surwit et al., findet vor allem in Forschungsbereichen wie Diabetes oder Herzkreislauferkrankungen Anwendung (Surwit et al. 1988). Durch Fütterung, stark mit vor allem gesättigten Fetten angereicherter Nahrung (bis zu 60 kcal%), entwickeln die Tiere einen typischen adipösen Phänotyp. Schon nach kurzer Zeit lassen sich eine starke Gewichtszunahme und Folgeerkrankungen wie Diabetes, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie (Surwit et al. 1988; Surwit et al. 1995) und Bluthochdruck (Mills et al. 1993), sowie einen Anstieg von LDL-Cholesterin im Plasma (Dietschy 1998) bei den Tieren beobachten. Die Modelle stellen somit einen geeigneten Hintergrund zur Untersuchung von Alterungserscheinungen aufgrund metabolischer Veränderungen im Myokard dar.

2.3 Herzinsuffizienz

In Europa ist die Herzinsuffizienz eine der häufigsten internistischen Erkrankungen mit geschätzt mehr als 28 Mio. Betroffenen (Quelle: www.heartfailurematters.org). Die Herzinsuffizienz bezeichnet eine verminderte Leistungsfähigkeit des Myokards, bei der grundlegend die systolische Herzinsuffizienz mit verminderter Pumpfunktion von der diastolischen Herzinsuffizienz mit gestörter kardialer Relaxation unterschieden wird, welche sowohl den linken als auch den rechten Ventrikel betreffen kann. Am häufigsten findet man eine Insuffizienz des linken Ventrikels (Linksherzinsuffizienz). Ursachen für die Entstehung von linksseitiger Herzinsuffizienz können neben langjähriger arterieller Hypertonie, KHK, Myokarditis, auch Aorten- oder Mitralklappenerkrankungen sein. Für die Diagnostik einer Herzinsuffizienz kann neben der in der Alltagsroutine verwendeten Echokardiographie die Plasmakonzentration des Brain Natriuretic Peptide (BNP bzw. NTproBNP) bestimmt werden. BNP wird im Herz in den Ventrikeln exprimiert als Reaktion auf die Dehnung der Herzwand, bei hypertropher Kardiomyopathie, diastolischer Dysfunktion und LV Hypertrophie. In diesem Zusammenhang korrelieren die Plasmalevel von BNP mit dem myokardialen Masseindex sowie der interventrikulären und posterioren Wanddicke. Im Fall von akuter Herzinsuffizienz sind sehr hohe Plasma-Konzentrationen an BNP im Patienten nachweisbar (Palazzuoli et al. 2010).

Kennzeichnend für das insuffiziente Herz sind ebenfalls Abweichungen in der oxidativen Kapazität, eine veränderte Mitochondrienzahl sowie die Bevorzugung bestimmter Substrate, was auf metabolische Veränderungen hindeutet. Zusätzlich findet man im humanen und murinen insuffizienten Herz eine niedrige Phosphokreatin/ATP-Ratio (Hardy et al. 1991; Neubauer et al. 1995). Ursachen hierfür sind Defekte des Kreatin-Kinase-Energie-Transport-Systems, welche auf einer

verminderten Aktivität der Kreatinin-Kinase und ihrer mitochondrialen Isoform beruhen. Dies wurde im insuffizienten humanen Myokard und bei verschiedenen Mausmodellen für Herzschwäche nachgewiesen (Lygate et al. 2007). Eine gesteigerte Sympathikusaktivierung bei chronischer Herzinsuffizienz verursacht zudem eine erhöhte Lipolyse im Fettgewebe und führt somit zu veränderten Konzentrationen der freien Fettsäuren im Plasma, welche wiederum die Aufnahme von Fettsäuren in das Myokard stark determiniert (Lionetti et al. 2011).

Folgeerscheinungen, wie beispielsweise eine verminderte systolische Kontraktionskraft, oder eine verzögerte diastolische Relaxation, können auf Änderungen im Ca^{2+} -Ionen-Austausch der Mitochondrien zurückgeführt werden. Aufgrund einer verringerten Expression der sarkoplasmatischen Ca-ATPase (SERCA2) kommt es zu einer Abschwächung der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen und einem Anstieg dieser im Cytosol aufgrund einer verminderten Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum. Diese Folgeerscheinungen stellen gleichzeitig die Ursache für eine weitere Verschlechterung der Herzfunktion dar.

Verschiedene Studien zeigen, dass reaktive Stoffwechselprodukte, beispielsweise reaktive Oxygen- und Nitrogenspezies (ROS, RNS), wie Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Peroxide, ebenfalls zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion führen. ROS und RNS entstehen bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse, aber vor allem beim mitochondrialen Elektronentransport. Hier vermutlich aufgrund eines Elektronenverlustes durch die Komplexe I und II der Atmungskette (Leak) (Tsutsui 2006). Mit der Entkopplung der Atmungskette schalten NO-Synthasen auf die Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle um. Auch Enzyme des kardialen Stoffwechsels, wie Xanthine- und Monoamin-Oxidasen, bilden Peroxid (H_2O_2), sowie hochreaktive Sauerstoffspezies (Burgoyne et al. 2012). NADPH-Oxidasen (Nox2; Nox4), welche in ihrer Funktion Elektronen auf Flavin- und Hämgruppen übertragen, katalysieren ebenfalls die Bildung von ROS (Burgoyne et al. 2012). Anhaltender oxidativer Stress im geschwächten Myokard resultiert in einer Schädigung der mtDNA und somit in weiterer ROS-Produktion, was zu zellulären Schäden und zunehmender Verschlechterung der Funktion führt. Die verstärkt gebildeten ROS verursachen eine weitere Freisetzung reaktiver Moleküle und führen letztendlich zu einer Herzinsuffizienz mit kontraktile Dysfunktion (Burgoyne et al. 2012).

2.4 Altersherz (Charakteristika)

Zu typischen altersbedingten Veränderungen des Herzmuskels zählen transmurale Fibrosen und Nekrosen, eine diastolische Dysfunktion, sowie Verkalkungen der Aortenklappe und des Mitralklappenringes. Auch die herznahen Gefäße sind

zunehmend versteift und weniger elastisch und begünstigen so die Entstehung einer arteriellen Hypertonie (Najjar et al. 2005). Die mit steigendem Alter auftretenden Veränderungen beeinflussen zunehmend die Funktion des Herzens. Ergebnisse sind erhöhter Blutdruck und eine linksventrikuläre Hypertrophie (Wessells and Bodmer 2007). Das hypertrophierte Gewebe nimmt an Gewicht mit zunehmendem Alter zu und weist vergrößerte Zellen bei verringerter Zellzahl auf (Biernacka and Frangogiannis 2011). In Kardiomyozyten von alten Nagern wurden zudem vergrößerte Mitochondrien nachgewiesen, welche weniger Cristae aufweisen als Mitochondrien im Gewebe junger Vergleichstiere (Rosca and Hoppel 2010). Dies resultiert in einer verminderten ATP-Produktion pro Zelle (Wong et al. 2010) im Alter und führt zu einem Funktionsverlust. So beschrieben Karavidas et al. mit zunehmendem Alter von über 60-jährigen eine Verminderung der aeroben Kapazität (Karavidas et al. 2010) sowie ein verringertes Herzzeitvolumen unter Belastung.

Bekannte Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie fettreiche Ernährung, Rauchen und genetische Prädisposition, beschleunigen diese Alterungsvorgänge (Yarnell et al. 2003; Kratz 2005; Kuller 2006; Menotti et al. 2006).

2.4.1 Veränderung an Myozyten

Morphologische Veränderungen des Myokards und der Gefäße im Alter bilden den Ausgangspunkt für kardiovaskuläre Erkrankungen. Sklerotische Veränderungen der Gefäße, Verkalkungen des Mitralklappenringes und der Aortenklappen sowie eine Amyloidose des Herzmuskels stellen die häufigsten Ursachen für beispielsweise Herzinfarkte, Myokardiopathien oder Rhythmusstörungen dar (Quelle: Handbuch der internistischen Geriatrie; Karl Heinz Tragl, Springer Verlag).

Gekennzeichnet ist das alternde Myokard vor allem durch einen Rückgang an Myozyten aufgrund apoptotischer und nekrotischer Vorgänge (Kwak 2013). Gleichzeitig vergrößern sich die verbleibenden Myozyten (Hypertrophie) und der Anteil der extrazellulären Matrix steigt. Strukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix sind insbesondere die verstärkte Einlagerung, der verringerte Abbau und die stärkere Vernetzung von Kollagenen und somit die Entstehung fibrotischen Gewebes. Trotz Rückgang der Muskelmasse mit fortschreitendem Alter zeigt die Ventrikelwandstärke keine Unterschiede aufgrund verstärkter Einlagerungen (Olivetti et al. 1991).

Konsequenz dieser strukturellen Veränderungen ist eine eingeschränkte kontraktile Funktion, die in systolischen und / oder diastolischen Dysfunktionen resultiert (Kwak 2013). Zusätzlich bedingt die zunehmende Versteifung und Verdickung des vergrößerten Herzmuskels aufgrund von Einlagerungen im Gewebe (Gates et al. 2003; Najjar et al. 2005) eine verminderte Relaxationsgeschwindigkeit. Dies führt zu einer

verzögerten frühdiastolischen Füllung des Ventrikels und bedingt die diastolische Funktionseinschränkung, welche zunächst durch eine verstärkte atriale Füllung ausgeglichen wird (Lakatta 1990). Da der Ventrikel bei Öffnen der Mitralklappe in der frühdiastolischen Phase des Füllens versteift bleibt, sinkt das Enddiastolische Volumen und verursacht einen Anstieg des linksventrikulären Füllungsdruckes (Lakatta 1990). Der ansteigende Druck im linken Herzen führt zu einer nachlastbedingten kompensatorischen Hypertrophie mit Dehnung des linken Vorhofs und linken Ventrikels (Strait and Lakatta 2012). Die Drucksteigerung im Vorhof führt zu einer verbesserten Füllung des Ventrikels, ist aber verbunden mit einer erhöhten Fibrosierung des Gewebes.

Diese altersabhängigen Veränderungen betreffen auch das Reizleitungssystem. So geht die Zahl der myozytären Schrittmacherzellen im Sinusknoten mit zunehmendem Alter zurück und wird durch Bindegewebe und Fettzellen ersetzt (Yanni et al. 2010). Als Ursache für die auftretende Relaxationsverzögerung ist neben einer Versteifung des Gewebes auch eine Störung der Kalzium-Homöostase zu nennen. Ein charakteristisches Merkmal des alternden Herzens ist beispielsweise die Verlangsamung der zellulären Kalzium-Transportprozesse. Die sich daraus ergebende intrazelluläre Kalzium-Überladung kann zu diastolischen Nachdepolarisationen und Tachyarrhythmien führen (Lakatta and Sollott 2002). Die geringere extrazelluläre Ca-Konzentration führt zur verminderten Kontraktionskraft aufgrund fehlender Aktivierung kontraktile Proteine (Hasenfuss et al. 1994).

2.4.2 Stoffwechsel

Das adulte Myokard ist durch einen hohen aeroben Stoffwechsel gekennzeichnet. Dabei deckt die Verstoffwechselung von Fettsäuren nahezu 70% des ATP-Bedarfs (Hue and Taegtmeyer 2009). Jedoch kann man mit zunehmendem Alter eine Verschiebung des Substratmetabolismus beobachten. Dies wurde bei der Untersuchung alter Mäuse und Ratten beobachtet (McMillin et al. 1993). Wie Odiet et al. in Versuchen mit Mäusen zeigen konnten, resultiert der Substratswitch vermutlich aus einer altersassoziierten Verminderung der Aktivität des Fettsäuretransporters CPT1 (Odiet et al. 1995). Einige Jahre später wiesen Kates et al. einen myokardialen Substratshift auch in alten (67 ± 5 Jahre) gegenüber jungen Patienten (26 ± 5 Jahre) nach (Kates et al. 2003). In diesem Zusammenhang wiesen Kates et al. nach, dass im Myokard gealterter Individuen sowohl der Fettsäureverbrauch als auch die Fettsäureoxidation reduziert sind, was sie aber weder auf altersbedingte Stoffwechselveränderungen noch einen verminderten Transport der Fettsäuren in die Mitochondrien zurückführen konnten (Kates et al. 2003). Die dadurch hohe

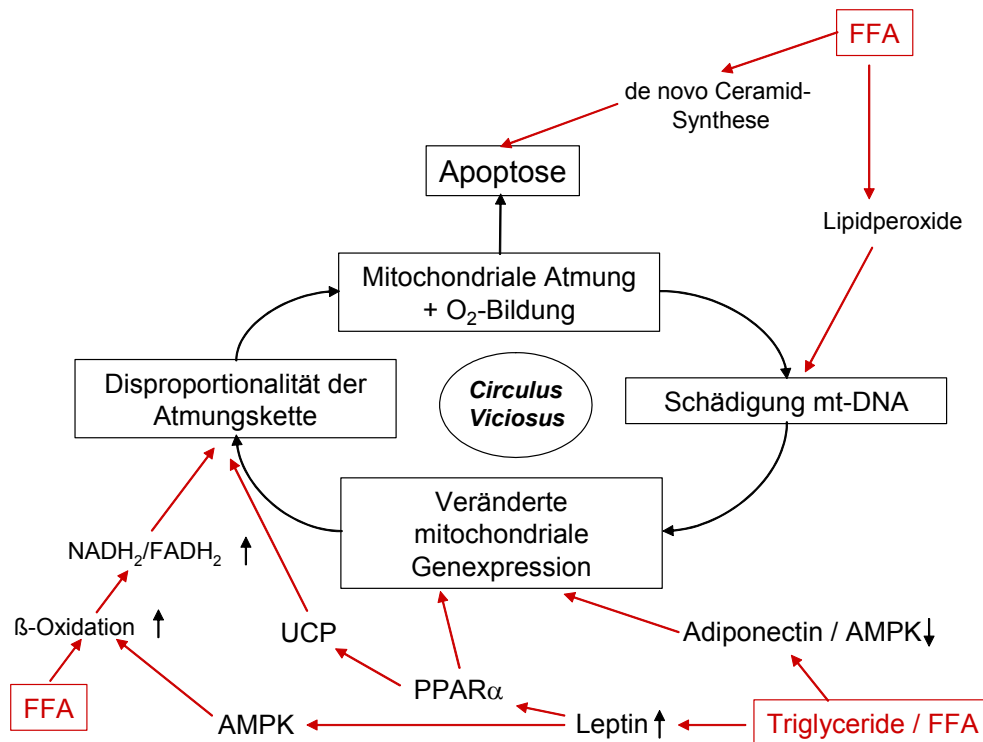
Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma wurde bereits von einigen Autoren als typische Ausgangssituation für die Entwicklung einer Insulinresistenz beschrieben (Shulman 2000; Eckel et al. 2005). Insulinresistenz wiederum wurde in späteren Untersuchungen mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Marwick 2008).

Einhergehend mit einem gesteigerten Glucose-Stoffwechsel beschrieben Ozaki et al. mit zunehmendem Alter eine verstärkte Expression des Glucose-Transporters GLUT4 im Myokard von Mäusen (Ozaki et al. 1996). Dagegen beobachteten Cartee et al. im Myokard der Ratte einen Rückgang der GLUT4-Expression (Cartee 1993).

Mit zunehmendem Alter ließ sich eine ansteigende oxidative Schädigung in nahezu allen Geweben, einschließlich des Herzmuskels, beobachten (Barja and Herrero 2000). Krishnan et al. vermuten, dass eine Akkumulation genetisch veränderter mtDNA-Moleküle eine fehlerhafte oxidative Phosphorylierung bedingt und zur Anreicherung von reaktiven Oxidantien führt. Nach der Theorie der mitochondrialen Alterung ist damit die hohe Dichte an Mitochondrien in den Kardiomyozyten eine Quelle reaktiver Sauerstoffspezies und die Ursache für eine verstärkte Alterung des Herzgewebes (Krishnan et al. 2007).

2.5 Zielstellung der Arbeit

Bisher standen arteriosklerotische Gefäßveränderungen im alternden Herz im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen, wohingegen altersabhängige metabolische Veränderungen an Kardiomyozyten selbst bei erhöhter exogener Zufuhr von Fetten noch nicht genau definiert sind. Ausgehend von metabolischen Veränderungen des gesamten Organismus gewann das Fettgewebe in seiner Funktion als endokrines Organ auch in diesem Zusammenhang mehr und mehr an Bedeutung. So ist in den letzten Jahren vor allem die Wirkung von Lipiden und Fettgewebshormonen auf das Myokard in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen stellt sich die Frage nach dem Einfluss von Lipiden und Adipokinen auf kardiovaskuläre Alterungsvorgänge. Fette und Fettsäuren können an verschiedenen Stellen des Metabolismus negativ in die komplexen Stoffwechselabläufe eingreifen. Schädigungen der mitochondrialen DNA führen zu Veränderungen der Genexpression, was einerseits Auswirkungen auf den Stoffwechsel hat, andererseits Disproportionalitäten der Atmungskette verursacht. Sowohl die erhöhte Stoffwechselaktivität als auch die veränderte mitochondriale Atmung führen verstärkt zur Bildung von ROS (Hebert et al. 2010). Vor allem Proteine, Lipide und Nukleinsäuren werden nachweislich durch die freigesetzten ROS geschädigt und verursachen weitere Beeinträchtigungen der mitochondrialen Atmung



Neben der bereits erwähnten de-novo Synthese von Ceramiden und Lipidperoxiden aus Fettsäuren kann die Verstoffwechselung von Fettsäuren zu einem Überangebot von Reduktionsäquivalenten (NADH/FADH) in der Zelle führen und ebenfalls eine Disproportionalität der Atmungskette bedingen.

15

Die folgenden Fragestellungen wurden untersucht:

1. Sind Anzeichen vorzeitiger Alterung auf Ebene der Genexpression in jungen Tieren durch fettreiche Diät induzierbar?
2. Ist im Myokard junger Tiere ein Funktionsverlust aufgrund mitochondrialer Dysfunktion durch den Einfluss fettreicher Diät vorzeitig nachweisbar?
3. Bewirkt eine Fütterung seneszenten Tiere mit fettreicher Diät einen beschleunigten kardialen Funktionsverlust?
4. Wie wirken gesättigte/ ungesättigte Fettsäuren auf den Metabolismus?
5. Wird AMPK als zentraler Stoffwechselregulator durch fettreiche Diät beeinflusst?
6. Wie wirken einzelne Fettsäure-Derivate auf den Aktivierungszustand der AMPK?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien allgemein

Tabelle 3-1 Übersicht zu verwendeten Chemikalien allgemein

Chemikalie	Hersteller
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich, St. Louis
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis
Albumin, Bovine BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Carl Roth GmbH + CO. KG
Albumin H2	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumazetat	Amersham Pharmacia Biotech Inc.
Ampliqon Taq®-Polymerase	Biomol GmbH
Antimyzin A	Sigma-Aldrich, St. Louis
APS	Merck KGaG, Darmstadt
Borsäure	Carl Roth GmbH + CO. KG
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis
Butanol	Carl Roth GmbH + CO. KG
BCIP	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis
Coenzym Q	Sigma-Aldrich, St. Louis
Coumarsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, St. Louis
Decylubichinol	Sigma-Aldrich, St. Louis
2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH + CO. KG
DTNB	Sigma-Aldrich, St. Louis
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Carl Roth GmbH + CO. KG
Essigsäure	Carl Roth GmbH + CO. KG
Ethanol abs	Carl Roth GmbH + CO. KG
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis
Formaldehyd	Carl Roth GmbH + CO. KG
Glutathion	Carl Roth GmbH + CO. KG
Glycerol	Carl Roth GmbH + CO. KG
Glycin	Carl Roth GmbH + CO. KG
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, Carl Roth GmbH + CO. KG
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + CO. KG
Kaliumazetat	Carl Roth GmbH + CO. KG
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis

Chemikalie	Hersteller
KCN	Merck KGaA, Darmstadt, Carl Roth GmbH + CO. KG
LB-Medium	Carl Roth GmbH + CO. KG
LB-Agar	Carl Roth GmbH + CO. KG
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumazetat	Sigma-Aldrich, St. Louis
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + CO. KG
Magermilchpulver	Milbona, AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis
Methylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis
Methylenblau	Sigma-Aldrich, St. Louis
NADH	Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + CO. KG
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
NBT (Nitroblue Tetrazolium)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis
OCT	Sakura Finetek Europe B.V.
Oxalacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt
2-Propanol	Sigma-Aldrich, St. Louis
RNase A	Boehringer Mannheim
Rotenon	Sigma-Aldrich, St. Louis
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Succinat	Sigma-Aldrich, St. Louis
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis
Tert-Butylalkohol	Carl Roth GmbH + CO. KG
Tetramethylendiamin (TEMED)	Fluka Chemie AG
TRI-Reagent	Sigma, PeqLab
Tris	Carl Roth GmbH + CO. KG
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal	AppliChem GmbH, Darmstadt

3.1.2 Chemikalien Zellkultur

Tabelle 3-2 Übersicht zu verwendeten Chemikalien in der Zellkultur

Chemikalie	Hersteller
DMEM	PAA Laboratories GmbH
FBS	Biochrom AG
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH
Glutamat	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH
Blasticidin	PAA Laboratories GmbH
PBS Tablets	GIBCO™ Invitrogen Corporation
Trypsin / EDTA	PAA Laboratories GmbH
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lipifectamin Plus™	Invitrogen
Lipofectamin 2000™	Invitrogen
Opti-MEM®I	GIBCO™ Invitrogen Corporation

3.1.3 Testsubstanzen / Fettsäuren

Tabelle 3-3 Übersicht der verwendeten Fettsäuren für die Zellversuche

Fettsäure	Hersteller
Palmitat	Sigma-Aldrich, St. Louis
Stearat	Sigma-Aldrich, St. Louis
Oleat	Sigma-Aldrich, St. Louis
DHA	Sigma-Aldrich, St. Louis

3.1.4 Molekulargewichtsmarker

Tabelle 3-4 Übersicht zu den verwendeten Maolekularmarkern

Molekulargewichtsmarker	Hersteller
SM #1811 PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas
#SM0321 GeneRuler™ 100bpDNA Ladder Plus	Fermentas
#SM0311 GeneRuler™ 1kbDNA Ladder	Fermentas
#SM0371 GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	Fermentas

3.1.5 Enzyme

Tabelle 3-5 Übersicht zu verwendeten Enzymen

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Promega, Heidelberg
GoTaqPolymerase Flexi®	Promega, Heidelberg
Pfu DNA Polymerase	Promega, Heidelberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionendonukleasen	New England Biolabs; Jena Bioscience, Jena
RNase A	AppliChem, Darmstadt
Rnasin®	Promega, Heidelberg
Super Script™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Promega, Heidelberg

3.1.6 Kits / Färbereagenzien / sonstiges

Tabelle 3-6 Übersicht zu verwendeten Kits, Färbereagenzien sowie sonstiger Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Nitrocellulosemembran	Kisker
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Mouse Tail Kit	Gentra, Peqlab
Midi Kit	Promega
Gelextraktionskit	Genomed, Qiagen
BCA Protein Assay Kit	Pierce
NEFA C	Wako Chemicals, Neuss
Triglyceride Determination Kit	Sigma Aldrich, ELISA
Mouse and Rat Leptin ELISA	Bivendor
Mouse Insulin Assay ELISA	Mercodia
Assay Max Human Adiponektin (Acrp30) ELISA Kit	Assay Pro
Lectin-TRITC labeled von Tritium vulgare (#L5266)	Sigma
Vector VECTASHIELD H-1000 (Einbettmedium)	Vector Laboratories
Oil Red-O, O-9755	Sigma-Aldrich, St. Louis
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis
Siriusrot F3BA	Sigma-Aldrich, St. Louis
Entellan ⁷ Neu (Schnelleindeckmittel)	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems

3.1.7 Geräte

Tabelle 3-7 Übersicht aller verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler, Thermoshake	Gerhardt
Brutschrank (Bakterien)	VWR
Zellkulturschrank	Memmert (Inco2), Nunc (Cellstar)
Labsonic, Ultraschall	B.Braun
Tisch- und Kühlzentrifugen	Eppendorf
Power Supply	Consort
Refridgerated Superspeed Zentrifuge RC-5B	Sorvall, Newton USA
UV Transilluminator	Bioview
Spektralphotometer	50 Scan Varian
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Präzisionswaage, Feinwaage	Sartorius
Oxygraph/ Oxygraph-2k	OROBROS
Ultra Turrax T8	IKA-Werke
Proteingelelektrophorese Mini-Protean II	BioRad
PCR-Cycler	Biometra
Sequenzier ABI 3100 Genetic AnalyzerC	Applied Biosystems

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolation von RNA aus Gewebe und Zellen

3.2.1.1 Gewebe

Zur RNA-Isolation wurden 25 - 50mg tiefgefrorenen Gewebes mechanisch zerkleinert, in einem entsprechenden Vol (Herstellerangaben) TRI-Reagenz (Sigma) aufgenommen und mittels Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat kann nach diesem Schritt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren werden.

Die Zugabe von 1/5 Vol an eingesetztem TRI-Reagenz Chloroform und eine kurze Durchmischung auf dem Vortexer, gefolgt von 2 - 15' min Inkubation bei RT, ermöglichte die Extraktion der RNA. Nach Zentrifugation (15' bei 14.000 rpm) wurde die wässrige Oberphase in ein neues Tube überführt.

Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von $\frac{1}{2}$ Vol (eingesetztem TRI) Isopropanol für 5 - 10' bei RT nach kurzem Vortexen. Die RNA wurde bei 4°C und 14.000 rpm für 15' sedimentiert und nach Dekantieren des Überstandes mit mindestens 500 μl 70%igem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15' bei 14.000 rpm, 4°C) wurde das RNA-Pellet bei RT kurz getrocknet und anschließend in einem adäquaten Vol DEPC-Wasser aufgenommen. Zur besseren Lösung der RNA wurde diese 1 h auf Eis stehen gelassen und anschliessend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop durch Doppelbestimmung.

3.2.1.2 Zellen

Im ersten Schritt der Isolation von RNA wurden diese 1 x mit PBS gewaschen und nach Zugabe von TRI-Reagenz mit Hilfe eines kleinen Schabers von der Schale gelöst. Die weiteren Schritte erfolgten analog der unter 3.2.1.1 beschriebenen Methode bei der Isolation aus Gewebe.

3.2.2 cDNA Synthese (Reverse Transkription – RT-PCR)

Die isolierte RNA wurde verdünnt, nochmals die Konzentration bestimmt und 500 ng RNA bei der reversen Transkription eingesetzt. Nach Denaturierung dieser bei 72°C für 3' wurde der Reaktionsansatz zugegeben:

Substanz	Volumen in μl
30 $\mu\text{g/ml}$ random Primer	3.0
12.5 mM dNTP	1.0
40 U/ μl RNase out (Ribonuclease inhibitor)	0.25
200 U/ μl Reverse Transkriptase	0.25
DEPC dH ₂ O	5.5

Reaktionsbedingungen (42 °C 30'; 95 °C 1'; 4 °C Pause)

Die fertige cDNA wurde 1:1 mit Aqua bidest verdünnt und zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert für semiquantitative und quantitative Analysen.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Die PCR-Reaktion erfolgte für semiquantitative Analysen in einem 25 μl -Ansatz. Hierfür wurde folgender Ansatz pipettiert:

Substanz	Volumen in μl
cDNA	20 ng
10x GoTaq FlexiPuffer	2.5
25 mM MgCl ₂	0.75
100 pmol dNTP	je 0.5
GoTaq Flexi Polymerase	0.25
DEPC dH ₂ O	18.5

Reaktionsbedingungen (95 °C 2'; X Zyklen x [95 °C 30", x °C 30", 72 °C 30"], 72 °C 2', 4 °C Pause)

Das PCR-Programm wurde nur hinsichtlich Annealing-Temperatur und Expressionsstärke der jeweiligen Primer angepasst. Die Kontrolle der Amplifikate erfolgte durch Auftragen dieser auf 1 - 2%igen TBE-Agarose-Gelen und Auswertung mittels Geldokumentations-Gerät und Software (Biostep, ArgusX1, Total Lab, SigmaStat, SigmaPlot)

TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8,0)
6x Probenpuffer (DNA) (50% (v/v) Glycerol, 0,5 M Tris pH 8,0, 1 Spatelspitze Bromphenolblau)

Eine Übersicht der verwendeten Primer ist in der folgenden Tabelle zusammen gestellt.

Tabelle 3-8 Übersicht aller verwendeten Primer

Gen	sense	antisense
AcCoACarb1	TCTGATTTGGGGATCTCTGG	GAGCAGTTCTGGGAGTTTCG
AcCoACarb2	ACAGGGTCATAGAGAAGGTGCT	CAGGGTAAGGTTGGGATTTG
AcCoAOx	ACCTTCACTTGGGCATGTTC	GGCATGTAACCCGTAGCACT
AR1	ACGTTGGAGAGTCATCCCGTAT	CTCTGTGTGGATGCGGAAGAT
AR2	GCCCATCATGCTATGGAACG	CTAGGAGATGTGTCCAAATGTTGC
Adiponektin	GCAGAGATGGCACTCCTGGA	CCCTTCAGCTCCTGTCAATCC
Alpha1AMPK	CCCCTATTATTTGCGTGTGC	ACTTCTGAGGGCTTTCCTTGA
Alpha2AMPK	AGCATCGATGATGAGGTGGT	CAACGGGCTAAAGCAGTGAT
ANP	ATGGGCTCCTTCTCCATC	GTGTTGGACACCGCACTGTA
Beta1AMPK	ACCGTATTTTCGATGGACAGG	CCCGTGTCTTGTTCAGAT
Beta2AMPK	TTCTTTGTGGACGGACAGTG	TCTTGTAGCGATGGGTTGC
Beta-Actin mouse	TGTTACCAACTGGGACGACA	CCATCACAATGCCTGTGGTA
Bcl-xL/S MAus neu(#3)_qPCR_s	GGATGGCCACCTATCTGAAT	
BNP	CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT	CCTTGGTCCTTCAAGAGCTG
CD36	GCAAAGAAGGAAAGCCTGTG	TCTACCATGCCAAGGAGCTT
COL1A1	ACCCGAGGTATGCTTGATCT	CCTCGACTCCTACATCTTCT
COL1A3	AACCTGGAAGGGATGGAAC	ATGCCATTAGAGCCACGTTT
COX1	GGAGCCCCAGATATAGCATT	TGTGTTTAGGTTGCGGTCTG
COX3	CGTGAAGGAACCTACCAAGG	TTCTGAAGCTTGGAGGATGG
CPT1	CACGAAGCCCTCAAACAGAT	CCAGAGCCCTGTACCAAAGA
CTRP2	ATACCGCATTCGGACTTTTG	GAAGAGGCCATTCTGCTCTG
CTRP7	CCTTGCTGGTGAGAAAGGAG	TATCCGGTACTGCCATTGT
EDN1	ACTTCTGCCACCTGGACATC	ACTTTGGCCCTGAGTTCTT
FAS	AAGTTGCCCGAGTCAGAGAA	GGAGTGAGGCTGGGTTGATA
FIAF	GCATGGCTGCCTGTGGTAAC	AAGAGTTCCTGGCAGTCCCG
Gamma1AMPK	ACGAACTGGAGGAGCACAAG	CAAAGTAGTGGGACCGATGC
Gamma2AMPK	TTCCAGGAGGAAGAAGACTCAG	ATTCACCAAAGGCTTGAAGGT
Gamma3AMPK	AGTCTCCATCTCTCCAATGA	TACAGCCAAATCTCGGAATG
GLUT4	TCATTCTTGGACGGTTCCTC	ATTGGACGCTCTCTCTCAA
IMR 1151/1152 (Leptin- Genotypisierung)	TGTCCAAGATGGACCAGACTC	ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA
Leptin	TTCACACACGCAGTCGGTAT	CCACCACCTCTGTGGAGTAGA
MKP1	AAGGATGCTGGAGGGAGAGT	AAGCTGAAGTTCGGGGAGAT
MMP8	TCAACCAGGCCAAGGTATTG	TTGGATGGGGTTGTCTGAAG
MMP9	AGCACAAACAGCTGACTACGA	GACAGAAACCCCACTTCTTG
ND1	CTCCTCGTCCCCATTCTAATC	TGAAATTGTTTGGGCTACGG
ND5	TGGCAGACGAACAAGACATC	TTGTGAGGACTGGAATGCTG
ND6	TGGTTTTAGGGTTTGGTGGA	GCTACCCCAATCCCTCCTT
NRF1	GCACCTTTGGAGAATGTGGT	GGTGGCCTGAGTTTGTGTTT
pcDNA3.1_HIII+1bp fw_b	TACCGAGCTCAGGATCCA	
pcDNA3.1_HIII+2bp fw_a	TACCGAGCTCAAGGATCCACTA	
pcDNA3.1_HIII+2bp fw_c	TACCGAGCTCGGATCCACTAAA	
pcDNA3.1_HIII+2bp fw_d	TACCGAGCTCGGATCCACTAA	

Gen	sense	antisense
pcDNA3.1 rev_e	CAACAGATGGCTGGCAACTA	
PDK4	AAAGATGCTCTGCGACCACT	GAGACGAGAAATTGGCAAGC
SCD1	CTGACCTGAAAGCCGAGAAG	TAGTCGAAGGGGAAGGTGTG
SCD4	GCCACCGAACCTATAAAGCA	TACCAGTGTGGGCAGAATGA
SERCA2	GCCTCTACAGCAACCTTCAGC	CGACAGACCGTGCATGTAG
tCAD	TACCCAACTGTGGCTGAGGT	TGAGGAGAGAGAAGAGCAGCA
TNFalpha	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
pcDNA4/3.1_muta_sense /antisense 07/07	CTTTAGCCCGTGGATCTGTCTCTAGT AAGGGCG	CGCCCTTACTAGAGACAGATCCACGGGCTAA AG

3.2.4 Klonierung von DNA

Für die Klonierung wurden die DNA-Fragmente mittels Proofreading Polymerase amplifiziert.

3.2.4.1 Klonierung alpha2AMPK

Die cDNA des humanen *alpha2AMPK* wurde in die Vektoren pcDNA3.1/V5-HIS-TOPO (vgl. Abb. 3-1) und pcDNA4/TO/*myc*-HIS (ohne Abb.) unter Verwendung der T4-Ligase von Fermentas kloniert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C gemäß dem Ansatz:

Substanz	Volumen in µl
5 x ligase buffer	2.0
Template (Vektor/2ng)	x
<i>alpha2AMPK</i> cDNA (30ng)	x
T4-Ligase (1 Weissunit)	1.0
DEPC dH ₂ O	ad 10 µl

Zur Expression des Proteins mit angehängtem Tag musste das Stopcodon der cDNA mutiert werden. Dies erfolgte mittels Stratagene Quickchange Site Directed Mutagenesis Kit. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

Substanz	Volumen in µl
10 x reaction buffer	2.5
Template (Midipräparation)	1.0
100 pmol Primer	je 0.5
dNTP Mix	0.5
Quick solution (XL-Kit)	1.5
Pfu Ultra High Fidelity Polymerase	0.25
DEPC dH ₂ O	18.5

Reaktionsbedingungen (95 °C 2', 18 x [95 °C 50", 60 °C 50", 68 °C 2,5'/1 kb], 68 °C 7', 4 °C Pause)

3.2.5 Vektoren

Tabelle 3-9 Übersicht zu verwendeten Vektoren zur Klonierung und Überexpression

Vektor	Hersteller
pcDNA 3.1 V5-His-TOPO	Invitrogen
pGEMT	Promega
pcDNA 3.1(+)	Invitrogen
pcDNA 6 / TR	Invitrogen

3.2.5.1 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli Zellen

1 µl des Ligationsansatzes wurde nach Denaturierung (10' bei 68 °C) in elektrokompetente TOP10-E.coli transformiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf dem Schüttler wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agar mit entsprechendem Selektionsagens ausplattiert.

Bakterienstamm

Zur Transformation wurden elektrokompetente Bakterien von Invitrogen verwendet:

TOP10 Electrocomp™ (C644) -

F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15
Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU*

galK

rpsL *endA1* *nupG*

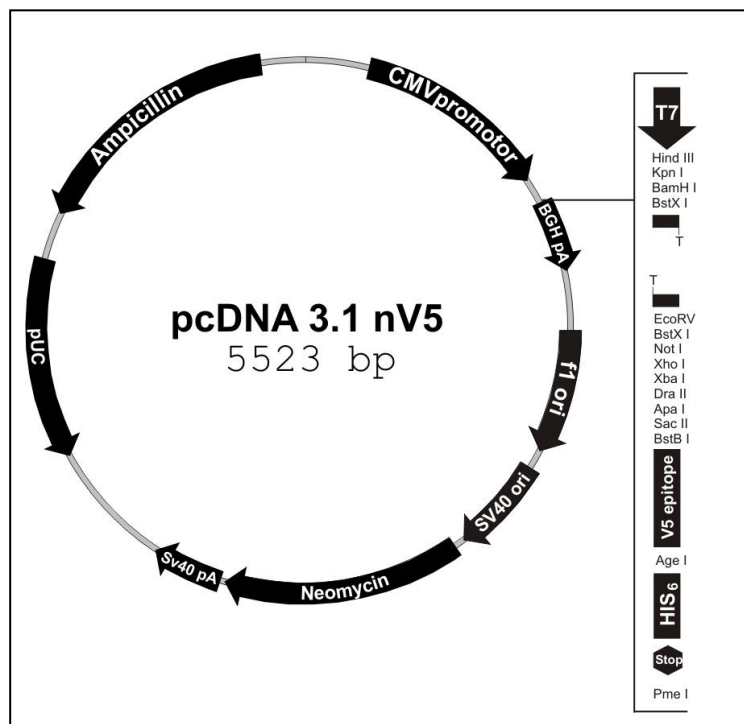


Abbildung 3-1 Klonierungsvektor - pcDNA 3.1 nV5

3.2.5.2 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

200 - 300 ng der isolierten DNA wurden nach der Ketten-Abbruchmethode nach Sanger sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) durchgeführt und folgender Ansatz pipettiert:

Substanz	Volumen in µl
5 x reaction buffer	2
Template (Midipräparation)	200 – 300 ng
10 pmol Primer	1.0
Sequenzierpremix	4

Reaktionsbedingungen (96 °C 1', 30x [96 °C 30'', 58 °C 15'', 60 °C 4'], 4 °C Pause)

Tabelle 3-10 Übersicht zu verwendeten Sequenzierprimern

Gen	sense	antisense
Alpha2AMPK	AGCATCGATGATGAGGTGGT	CAACGGGCTAAAGCAGTGAT
pcDNA3.1 fw	GTAAACGACGGCCAG	-
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-
SP6	-	ATTTAGGTGACACTATAG

Die Sequenzierung erfolgte in einem Sequenzer der Firma Applied Biosystems ABI 3100 Genetic AnalyzerC. Die Auswertung der erhaltenen Sequenz erfolgte mittels VectorNTI6.0-Programm und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA (DNA-Minipräparation / Midipräparation)

2 ml einer 3 ml-Übernachtskultur wurden 10' bei 6.000 rpm sedimentiert, das Bakterienpellet in 200 µl P1 resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl P2 kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fällung der Proteine erfolgte anschließend durch Zugabe von 200 µl P3 und kurzem Vortexen. Die so lysierten Bakterien wurden bei RT 30' bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in einen neuen Tube überführt. Die Zugabe von 600 µl Isopropanol, mehrmaligem Invertieren und die nachfolgende Zentrifugation für 10' bei 14.000 rpm fällte die Plasmid-DNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit mindestens 500 µl 70%igem EtOH gewaschen. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes und kurzem Trocknen der Plasmid-DNA erfolgte die Resuspendierung in einem entsprechenden Vol TE-Puffer oder Aqua-bidest. Zur Kontrolle wurden 500 ng-1 µg mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut oder 200 - 300 ng zur Sequenzierung eingesetzt.

Von dem so ermittelten korrekten Klon diente der Rest der Übernachtskultur zum Animpfen einer Midi-Kultur (100-200ml). Am nächsten Tag, bei Erreichen einer OD von

0,5 wurden Glycerol-Stocks der Bakterienkultur angefertigt. Hierfür wurden 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl sterilem 30%-igem Glycerol versetzt und nach 15' Inkubation bei RT bei –80 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

Die restliche Bakterienkultur wurde bei 6000 g für 15 min bei 4 °C sedimentiert und die Plasmid-DNA im Anschluss mittels des QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit isoliert. Der Aufschluss der Bakterien und die Fällung der Proteine erfolgten gemäß Herstellerangaben. Der Überstand wurde auf eine Säule überführt, wo die Plasmid-DNA an die in der Säule befindlichen Partikel gebunden und im Anschluss mit Waschpuffer gereinigt wurde. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte entweder mit dem im Kit enthaltenen Elutionspuffer oder Aqua bidest (500 µl). Die mit Hilfe der Plasmid-Präparationskits isolierten Plasmide sind endotoxinfrei und somit für Transfektion in Zellkulturlinien einsetzbar.

Plasmid-Präparation

P1	10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8,0, 100 µg/ml RNaseA
P2	0,2 M NaOH, 1% SDS
P3	3 M KAc pH 5,5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

3.2.6 Isolation von Proteinen aus Gewebe

Zur Isolation von Proteinen wurden folgende Puffer verwendet: Sucrose-Puffer zur Proteinisolierung aus tierischem Gewebe und SDS-Lysis-Puffer für Zellen. Beiden Puffern wurden direkt vor Verwendung Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugesetzt (je 1 : 200).

Sucrose-Puffer	(0,32 mM Sucrose, 10 mM Tris pH 8,0, 3 mM CaCl ₂ , 2 mM MgAc, 0,1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT; direkt vor Verwendung frisch zugeben: Protease-Inhibitor 1 : 200, Phosphatase-Inhibitor Cocktail 1 : 200, 50µg/ml Saponin)
SDS-Lysis-Puffer	(50 mM Tris (pH 8,3); 1 % SDS; 2 mM EDTA;
6x SDS-Probenpuffer	(120 mM DTT, 70 mM Tris pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) Glycerol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau)

3.2.6.1 Gewebe

Das tiefgefrorene Gewebe wurde mechanisch zerkleinert, in 10 Vol Sucrose-Puffer (vgl. 3.1.2) an eingesetztem Gewicht aufgenommen und mittels Ultraturrax

homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt der Proben von 20' bei 14.000 rpm und 4 °C. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Tube überführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben 1 : 20 verdünnt und mittels BCATM Protein AssayKit (Pierce USA) als Doppelbestimmung vermessen. 45 - 100 µg wurden in SDS-Probenpuffer denaturiert und auf einem 7,5 - 12,5%igen Gel aufgetrennt.

3.2.6.2 Zellen

Das Ablösen der Zellen erfolgte unter Verwendung kleiner Schaber und 150 µl SDS-Lysis-Puffer je Well einer 6-Well-Platte bzw. 300 µl je 60 mm-Schalen (vgl. 3.1.2). Die Zellen wurden anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen und danach für 30' auf Eis inkubiert. Die nachfolgende Zentrifugation für 5' bei 14.000 rpm und 4 °C war erforderlich um den Überstand ohne Zelltrümmer in einen neuen Tube zu überführen.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte adäquat zu den Zellen. Die Proben wurden dafür 1 : 10 verdünnt vermessen, zur weiteren Verwendung in SDS-Probenpuffer aufgenommen, denaturiert und auf einem 7,5 - 12,5%igen Gel aufgetrennt.

3.2.7 Proteinanalyse

3.2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoreses (SDS-PAGE)

Die in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteine wurden 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Analyse wurden zwischen 20 µg und 100 µg Protein auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Konzentration des Laufgels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine (z. B. alpha2AMPK mittels 10 % SDS Laufgel) Verwendet wurden Mini-Protean II - Gelapparaturen der Firma Bio-Rad. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 15 - 20mA/Gel und im Laufgel bei 30 - 40 mA/Gel.

Zusammensetzung der Gele

Konzentration	Laufgel		Sammelgel
	10 %	12,5 %	5 %
Aqua bidest	4,30 ml	3,55 ml	2,95 ml
40 % Acrylamid	3,00 ml	3,75 ml	0,50 ml
Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	4,50 ml	4,50 ml	-
Puffer (1 M Tris-HCl, pH 6,8)	-	-	0,50 ml
10 % SDS	120 µl	120 µl	40 µl
10 x APS	100 µl	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	5 µl

3.2.7.2 Western-Blotting und Antikörperfärbung

Für die anschließende Antikörperfärbung mussten die Proteine auf Nitrocellulosemembran (vgl. 3.1.6.) übertragen werden. Hierfür wurden die separierten Proteine mittels Nass-Blot-Verfahrens vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgte über 60 - 80 min bei 100 - 120 V bei einer Temperatur von 4 °C, um ein Überhitzen der Proteine zu verhindern. Zum Nachweis der gebundenen Proteine auf der Membran wurde diese 5 - 10' mit PonceauS reversibel gefärbt. Die Aufhebung der reversiblen Färbung geschah durch Benetzen der Membran mit Wasser. Anschließend zur Absättigung freier Bereiche, wurde die Membran mit 5 % Trockenmilch 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Immunfärbung erfolgte mittels proteinspezifischer Antikörper 1 h bei RT oder über Nacht ebenfalls unter leichtem Schwenken. Danach wurde die Membran 3 x 10' bei RT mit 1 x TBST gewaschen. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde ein sekundärer Antikörper auf die Membran gegeben und 1h bei RT inkubiert. Im Anschluß, nach erneutem 3 maligem waschen, erfolgte die Färbung der Membran je nach Art des sekundären Antikörpers. Bei Verwendung der HRP wurde frisch hergestellte Chemilumineszenz-Reagenz (ECL-Reagenz) aufgetragen, 1 min inkubiert und anschließend ein Lumineszenz-Film aufgelegt. Die Filme wurden mit Kodak D-19 Developer entwickelt, kurz in Wasser gewaschen und mit Kodak GBX fixer/replenisher fixiert.

Bei Immunfärbungen mittels Alkalischer Phosphatase erfolgte der Nachweis direkt auf der Membran. Dafür wurde ein Gemisch aus BCIP und NBT aufgetragen und nach erfolgreicher Färbung durch Benetzen der Membran mit Wasser fixiert.

Die Auswertung der Blots war nach Einscannen mittels Argus-X1 Software (Biostep) und Totallab Software möglich.

Die verwendeten Antikörper mit entsprechender Konzentration sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst.

Laufgelpuffer	(1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
Sammelgelpuffer	(1 M Tris-HCl, pH 6,8)
6 x Probenpuffer (Protein)	(120 mM DTT, 70 mM Tris pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) Glycerol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau)
10 x Laufpuffer	(250 mM Tris, 2 M Glycin, 35 mM SDS)
Coomassie-Färbepuffer	(2 g Coomassie Brilliant Blue R250, 0,7 % Ethanol, 8,6 % Methanol, 17, 3 % Essigsäure)
Entfärbepuffer	(20 % Methanol, 10 % Essigsäure)
Blotpuffer	(25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % / 0,05 % (w/v))

	SDS, 20 % (v/v) Methanol)
10 x TBS	(1 M NaCl, 100 mM Tris)
1 x TBST	(100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,2 % Tween 20)
Ponceau S	(0,5 g Ponceau S, 1 % Essigsäure)
AP-Lösung	(AP-Puffer: 100 mM Tris-HC, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$; Reaktionsansatz: AP-Puffer, 0,33 mg/ml NBT in 70 % DMF, 0,165 mg/ml BCIP in 100 % DMF)
ECL-Lösung	(100 mM Tris-HCL (pH 8,5), 0,225 mM p-Coumarsäure, 1,25 mM Luminol, 0,009 % H_2O_2)

Verwendete Antikörper

Tabelle 3-11 Übersicht zu verwendeten Antikörpern für Western-Analysen mit Angabe der eingesetzten Konzentration

Antikörper	Hersteller	Spezies	Eingesetzte Verdünnung
GAPDH	Cell Signaling Technology, Inc.	Mouse, monoclonal	1 : 2000
pACC (Ser79)	Cell Signaling Technology, Inc.	Rabbit, polyclonal	1 : 1000
alphaAMPK	Cell Signaling Technology, Inc.	Rabbit, polyclonal	1 : 1000
alpha2AMPK	Cell Signaling Technology, Inc.	Rabbit, polyclonal	1 : 1000
phosphoAMPKalpha (Thr 172)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Rabbit, polyclonal	1 : 1000
Anti-rabbit IgG / HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Inc	rabbit	1 : 5000
Anti-rabbit IgG / AP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Inc	rabbit	1 : 5000
Anti-mouse IgG / HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Inc	mouse	1 : 5000
Anti-mouse IgG / AP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Inc	mouse	1 : 5000

3.2.8 Bestimmung von Fettsäure- und Triglycerid-Gehalt

Zur Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren und Triglyceriden in Gewebe und Serum wurden folgende Kits verwendet: TRI-Serum Triglyceride Determination Kit von Sigma und der NEFA C-ACS-ACOD-Methode enzymatischer Farbtest von WAKO. Durchgeführt wurde die Messung wie in dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA. Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) und unter Abgleich der Messwerte auf den Proteingehalt.

3.2.9 Bestimmung des Serumgehaltes von Adiponektin, Leptin und Insulin

3.2.9.1 Adiponektin-ELISA

Verwendet wurde der ELISA Kit von Assay Pro für Humanes Insulin (Acrp30), mit welchem laut Hersteller auch die Detektion von murinem Adiponektin möglich ist. Die Serumproben wurden 1 : 500 mit der im Kit enthaltenen Lösung verdünnt und je 50 µl im Doppelansatz auf den Gehalt an Adiponektin entsprechend der Herstelleranweisung untersucht.

Der Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 450 nm und unter Abgleich der Messwerte auf den Proteingehalt.

3.2.9.2 Insulin-ELISA

Verwendet wurde der ELISA Kit von Mercodia für die Detektion von Maus Insulin. Die Serumproben wurden unverdünnt zu je 25 µl im Doppelansatz auf den Gehalt an Insulin entsprechend der Herstelleranweisung untersucht. Die Serumproben sollten vor der Verwendung nicht mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren werden.

Der Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 450 nm und unter Abgleich der Messwerte auf den Proteingehalt.

3.2.9.3 Leptin-ELISA

Verwendet wurde der ELISA Kit von Biovendor für die Detektion von murinem Leptin. Die Serumproben wurden 1 : 20 verdünnt und zu je 100 µl im Doppelansatz auf den Gehalt an Leptin entsprechend der Herstelleranweisung untersucht. Bei der Verdünnung der Serumproben sollte darauf geachtet werden, dass es beim Vortexen nicht zu Schaumbildung kommt.

Der Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Lesegerät (Dynatech MR 5000; Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) bei 450 nm und unter Abgleich der Messwerte auf den Proteingehalt.

3.3 Tiermodell im Versuch

Für den Versuch wurden männliche Tiere des Stammes C57BL/6 ausgewählt. Die Durchführung der Versuche entsprach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen nach Antrag (2-666-MLU) sowie ausreichender Prüfung.

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (12 h Tag/12 h Nacht; 23 °C) gehalten, ad libitum gefüttert (in Haltung) und ständiger Zugang zu frischem Wasser gewährleistet. Während des Versuches waren die Tiere einzeln in Käfigen untergebracht. Aufgrund einer 14tägigen Analyse der täglichen Futteraufnahme wurde im Verlauf des Versuchs das Futter individuell für jedes Tier eingewogen und verabreicht. Die Tiere erhielten eine tägliche Futterration und es wurde die tägliche kcal-Aufnahme sowie wöchentlich das Gewicht der Tiere dokumentiert.

3.3.1 Mausstamm

C57BL/6J

(Quelle Bild: The Jackson Laboratory, USA)

C57BL/6 sind resistent gegen audiogen verursachte Anfälle, besitzen eine relativ geringe Knochendichte und entwickeln mit zunehmendem Alter einen Hörverlust.



Der Stamm ist homozygot für *Cdh23^{ahl}*, die Mutation für altersassoziierten Hörverlust. Die Tiere entwickeln ab einem Alter von durchschnittlich 10 Monaten einen progressiven Verlust des Gehörs.

Für die Durchführung des Fütterungsversuches wurden männliche Tiere im Alter von 3 (Gruppe juvenil) bzw. 18 Monaten (Gruppe adult) ausgewählt.

3.3.2 Einfluss fettreicher Nahrung

Tabelle 3-12 verabreichte Diät, Organentnahme, Histologie

Diät		
High Fat (Resarch Diets)	[HF]	4730 kcal
Haltungsdiät (Altromin)	[HD]	2500 kcal
Organentnahme		
LV, RV, Atria, M.gastrocnemius, M. quadriceps, Leber, Fettgewebe subcutan und visceral		
Einbettung für histologische Untersuchungen (Kryoeinbettung)		
LV, M. quadriceps, Fettgewebe subcutan und visceral		

Dabei erhielten die Tiere unter fettreicher Fütterung ihren täglichen kcal-Bedarf aus den speziellen Diäten, wobei z. B. bei fettreicher Diät der Hauptteil der kcal aus Schweineschmalz besteht.

Für den Versuch wurden juvenile und adulte Tiere 6 bzw. 14 Wochen mit den verschiedenen Diäten gefüttert.

Die adulten Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt:

HF / HD 6 Wochen Fütterung (n = 7)

HF / HD 14 Wochen Fütterung (n = 8)

Die juvenilen Tiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt:

HF / HD 6 Wochen Fütterung (n = 6)

HF / HD 14 Wochen Fütterung (n = 6)

Das Gewicht wurde wöchentlich notiert und am Ende des Versuchs wurde die Herzfunktion mittels transthorakaler Echokardiographie dokumentiert. Hierfür wurden die Tiere mit Isofluran während der Untersuchung narkotisiert.

3.3.3 Untersuchung der kardialen Funktion mittels transthorakaler Echokardiographie

3.3.3.1 Methoden der Echokardiographie

- M-Mode

Über die linksparasternale Längsachse wurden die Wanddicken bzw. Durchmesser des Interventrikularseptums (IVS), des linken Ventrikels (LVD) und der linksventrikulären Hinterwand (LVPW) in der Diastole (IVSd, LVDd, LVPWd) und in der Systole (IVSs, LVDs, LVPWs). LVEF u FS [%] aus dieser Messung abgeleitet. Die linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF) wurde automatisch nach der Formel von Teichholz: $EF = \frac{EDV - ESV}{EDV}$ über den integrierten Rechner des Ultraschallgerätes berechnet. Außerdem wurde noch die Verkürzungsfraktion (FS % - fractional shortening) erfasst. Beim fractional shortening handelt es sich um einen berechneten relativen Wert, der die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorganges beschreibt. Berechnet wird dieser aus dem größten und kleinsten Durchmesser der linken Herzkammer: $(LVEDd - LVESd) / LVEDd$

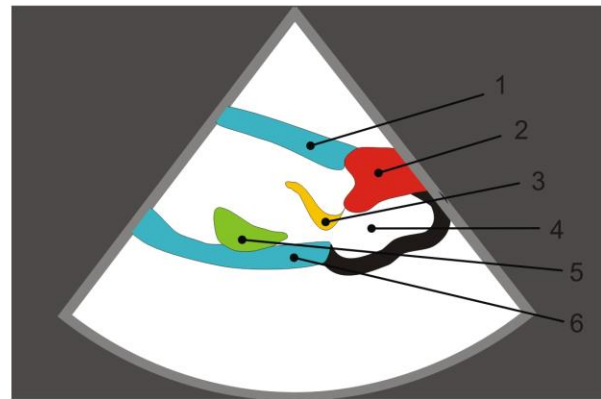
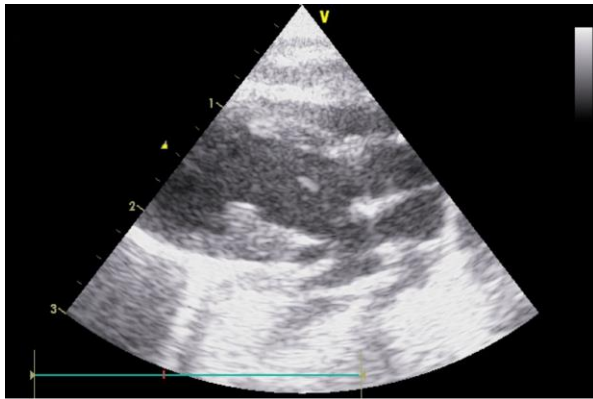


Abbildung 3-2 A Linksparasternale Längsachse - Schematische Darstellung rechts (1 – linker Ventrikel Vorderwand; 2 – Aorta und Artenklappe; 3 - Mitralklappe; 4 - linkes Atrium; 5 – Papillarmuskel; 6 – linker Ventrikel Hinterwand)

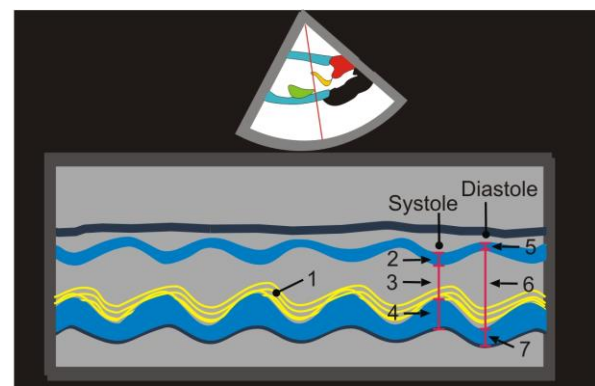
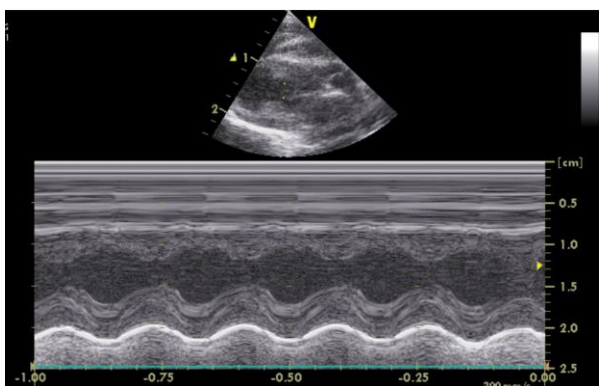


Abbildung 3-2 B Messung im M-Mode (linksparasternale Längsachse linker Ventrikel) - Schematische Darstellung rechts (1 - Mitralklappensegel; 2 / 5 - linker Ventrikel Vorderwand; 3 / 6 - linker Ventrikel; 4 / 7 - linker Ventrikel Hinterwand)

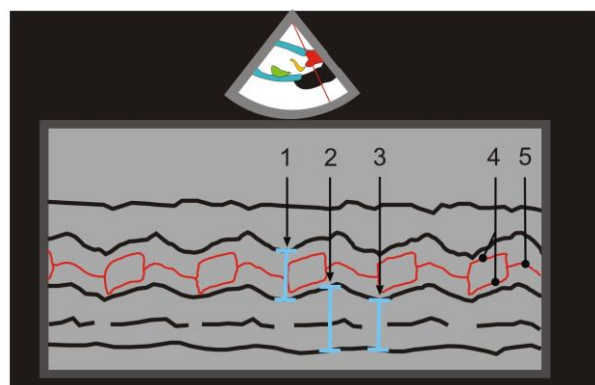
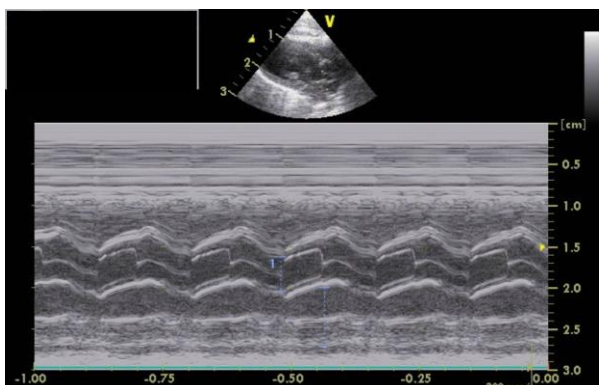


Abbildung 3-2 C Messung im M-Mode (linksparasternale Längsachse Aorta/Aortenklappe und linker Vorhof) - Schematische Darstellung rechts (1 - Aorta; 2 - linker Vorhof diastolisch; 3 – linker Vorhof systolisch; 4 – Aortenklappe offen; 5 – Aortenklappe geschlossen)

- Doppler-Verfahren

Im apikalen Vier-Kammer-Blick wurde mittels Doppler-Verfahren das transmitrale Flussprofil erstellt. Die sogenannte E-Welle entsteht durch den passiven Einstrom des Bluts in den linken Ventrikel im Rahmen der Entspannung des ventrikulären Myokards.

Die Berechnung des Verhältnisses der frühen (early) zur atrialen linksventrikulären Füllung (**E/A**) erfolgte über den integrierten Rechner des Gerätes. Die sogenannte E-Welle entsteht durch den passiven Einstrom des Bluts in den linken Ventrikel im Rahmen der Entspannung des ventrikulären Myokards. Die A-Welle stellt die Kontraktion des Vorhofes dar. Im Normalfall ist der passive Einstrom größer als die Pumpleistung des Vorhofs, so dass die Ratio (E/A) beim gesunden menschlichen Herzen zwischen 1,0 und 1,5 liegt. Die Dauer der A-Welle nimmt mit zunehmendem diastolischem Druck im linken Ventrikel ab.

Die Ergebnisse der Messung zum Ende des Versuchs wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet nach One-Way Anova bzw. t-test dargestellt.

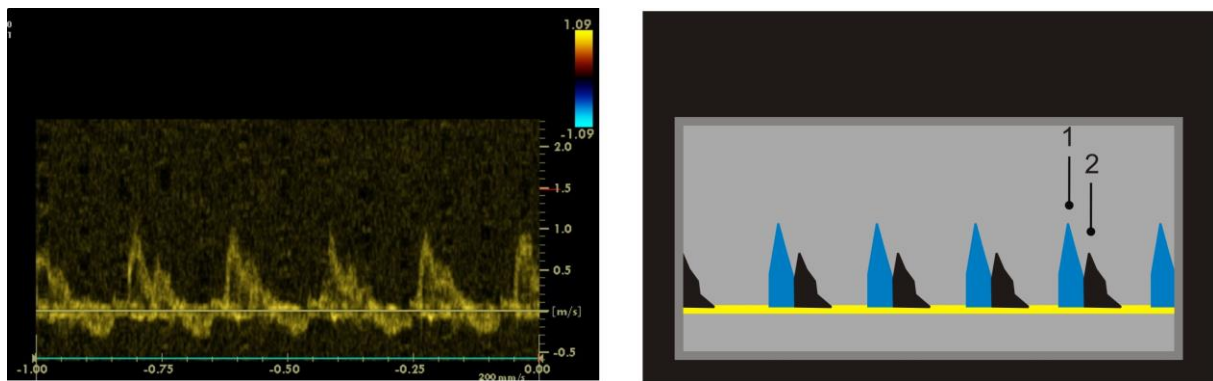


Abbildung 3-3 schematische Darstellung der Dopplermessung des transmitralen Durchflusses Schematische Darstellung (1 - E_{\max} passiver früher (early) Einstrom; 2 - A_{\max} später (atrial) Einstrom)

3.3.4 Histologie

3.3.4.1 Färbung von Fetteinlagerungen im Herzgewebe

Öl-Rot-O-Stammlösung (300 mg Oil Red-O, 100 ml Isopropanol gut mischen; bei RT max 3 Monate haltbar)

Öl-Rot-O-Arbeitslösung (24 ml Oil Red-O Stammlösung, 16 ml Aqua dest mischen, 10 min stehen lassen, filtrieren; max 3 h haltbar)

Die Kryoschnitte der Proben sollten eine maximale Dicke von 8 μm aufweisen. Zunächst wurden die Schnitte 10 min in 3,7 % Formaldehyd/PBS fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Färbung der so vorbereiteten Proben erfolgte für 10 min-1 h in der Öl-Rot-O-Arbeitslösung. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde eine Gegenfärbung der Kerne mit DAPI (1 : 5000) durchgeführt. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit Glycerin-Gelatine eingebettet. Nach Aufsetzen des Deckgläschens wurde dieses luftdicht mit Nagellack abgedichtet.

3.3.4.2 Zellmembran-Färbung von Kardiomyozyten mit Lectin

Färbung: Lectin-TRITC labeled von Tritium vulgaris

Fixierung: Vector VECTASHIELD

Die Kryoschnitte der Proben sollten eine maximale Dicke von 10 µm aufweisen. Zunächst wurden die Schnitte 10 min in 3,7 % Formaldehyd/PBS fixiert und anschließend mit PBS (2 x 2 min) und Wasser (5 min) gewaschen. Im Anschluss daran wurde das TRITC markierte Lectin 1 : 8 verdünnt mit 1 mM Tris pH 7,4 auf die Schnitte aufgetropft und für 1 h bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS kurz gewaschen (2 x 2 min) und anschließend mit DAPI die Zellkerne gegengefärbt (2 min). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (1 min) wurden die Schnitte mit Vector VECTASHIELD eingebettet.

Die Zellgrößen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop und dem Programm Image J ausgewertet.

3.3.4.3 Kollagen-Färbung von Kardiomyozyten mit Siriusrot nach Puchtler

Färbung: 0,1%ige Pikro-Siriusrot (F3BA)-Lösung

Fixierung: 0,01 N HCl-Lösung

Die Kryoschnitte der Proben sollten eine maximale Dicke von 5 µm aufweisen. Die Schnitte wurden 20 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte ähnlich Paraffin-Schnitten behandelt, um Hintergrund-Färbungen der Kardiomyozyten zu entfernen. Hierzu wurden die Schnitte 10 min bei RT in Xylol inkubiert und über eine absteigende Ethanol-Reihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) in Wasser übertragen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit 0,1%iger Siriusrot-Pikrinsäure-Lösung über 1 h bei 25 °C gefärbt. Im Anschluss daran wurden die gefärbten Schnitte 2 min in 0,01 N HCl-Lösung gewaschen. Mittels aufsteigender Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) wurden die Gewebeschnitte anschließend dehydriert und 2 x 10 min abschließend in Xylol getaucht. Die Einbettung der gefärbten Schnitte erfolgte mit Entellan-Medium.

3.3.5 Messung der Aktivität der Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase (Medium Chain Acyl CoA Dehydrogenase – MCAD)

Zur Messung der Enzymaktivitäten wurden zunächst Muskelhomogenate der in flüssigem Stickstoff gelagerten Proben hergestellt. Hierfür wurden etwa 30 mg kryokonserviertes Gewebe des linken Ventrikels sofort in eiskalten Chappel-Perry-Puffer (1/30 Gewicht/Volumen) überführt und auf Eis über 7 Minuten homogenisiert. 40 µl des Homogenates wurden für den Test nach Lehmann et al. eingesetzt (Lehman et al. 1990). Als Substrat wurde Octanoyl-CoA eingesetzt. Aufgrund des Substratabbaus wird Ferriceniumhexafluorophosphat durch die β -Oxidation zu Ferrocen reduziert.

Diese Reduktion in Form einer Extinktionsabnahme ist bei 300 nm und einer Temperatur von 25 °C an einem Spektralphotometer messbar. Nach Zugabe des Substrats und der Ferriciniumhexafluorophosphats wurden die Proben auf Eis gelagert und mussten innerhalb einer Stunde gemessen werden.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zelllinien

Tabelle 3-13 Übersicht zu verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Beschreibung
C2C12	Mus musculus	Myoblasten (Skelettmuskel)
H9C2	Rattus norvegicus	Kardiomyoblasten
HEK 293	Embryonale Nierentumorzellen Homo sapiens	human embryonic kidney"-Zellen

3.4.2 Kultivierung und Passagieren der Zelllinien

Medium folgender Zusammensetzung wurde zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien (Tab. 3-2) verwendet: DME-Medium (4,5 g/l Glucose, mit 10 % FBS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 4 mM Glutamat und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin). Das Passagieren der Zellen war bei Erreichen einer 60-80%igen Konfluenz erforderlich. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung überschichtet. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C löste sich der Zellrasen vom Boden der Schale ab. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die doppelte Menge an vorgewärmtem Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm 3 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (Trypan-Blau und Neubauer-Zählkammer) erfolgte die Aussaat der Zellen in entsprechender Zahl auf neue Kulturschalen. Für eine langfristige Lagerung der Zellen in Stickstoff wurden diese in Medium resuspendiert, das 10 % DMSO enthielt. Über Nacht wurden die so vorbereiteten Zellen bei –80 °C gelagert und danach in Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen im warmen Wasserbad aufgewärmt und zügig in Kulturmedium aufgenommen und auf der Schale verteilt. Am folgenden Tag sollte das Medium nochmals gewechselt werden.

3.4.3 Transfektion von HEK 293 und TRex HeLa

Die Transfektion der DNA erfolgte mittels Lipofektion. Entsprechend den Herstellerangaben wurde das Plasmid in Transfektionsmedium, Opti-MEM® (proteinarm – höhere Transfektionsraten), verdünnt und anschließend mit den

Liposomen (Lipofectamin) gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde das DNA-Liposomen-Gemisch auf die Zellen gegeben und nach 4 - 6h durch Kulturmedium ersetzt.

3.4.4 Behandlung von HEK 293 und TRex HeLa mit Fettsäuren

Zur Durchführung der verschiedenen Zellversuche wurden ausschließlich transient transfizierte und untransfizierte Zellen eingesetzt. Die Transfektion erfolgte dem in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Vorgehen. 24 h vor Behandlung der Zellen wurde die entsprechende Fettsäure in absolutem, 5 - 10 min mit Stickstoff durchgastem EtOH, gelöst. Die so gelöste Fettsäure wurde unter Rühren und unter ständiger Stickstoffbegasung zu einer 12,5%igen fettsäurefreien Albuminlösung tröpfchenweise zugegeben. Die Fettsäurebindung an das Albumin erfolgte während der anschließenden Inkubation der Lösung für 16 - 24 h bei 37 °C auf dem Schüttler. Ölsäure wurde bereits fertig gelöst geliefert. Zur Herstellung einer 100 mM Stammlösung wurde die Fettsäure in DMSO verdünnt und anschließend die Arbeitskonzentration/en mittels Kulturmedium eingestellt und den Zellen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 - 24h wurden die Zellen von der Schale abgeschabt und Proteine bzw. RNA isoliert. Der zur Extraktion der Proteine eingesetzte SDS-Lysispuffer enthielt Phosphatase- und Protease-Inhibitor in 200-facher Verdünnung. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einer adäquaten Menge DMSO behandelt.

3.5 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Sigma Stat Software V 1.3 (Sigma Stat Software Inc., Chicago USA). Zur Berechnung wurde der Student's T-Test sowie One-Way-Anova verwendet. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler. Ein ermittelter Wert von $P < 0,05$ (*) und $P < 0,01$ (**) ist als statistisch signifikant und $P < 0,001$ (***) statistisch hochsignifikant zu werten.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss Fütterung fettreicher Nahrung auf Körper- und Organgewicht

Während einer Eingewöhnungsphase wurde der tägliche Futterbedarf jedes Tieres ermittelt. Im Anschluss daran erhielten die 4 und 18 Monate alten Tiere über eine Dauer von 6 und 14 Wochen eine Haltungs- (im Folgenden als HD oder Kontrolle bezeichnet) oder eine fettreiche Diät (HF). Bei der HD handelt es sich um eine Standarddiät mit 2500 kcal/kg (Zusammensetzung siehe Anhang), die unter Haltungsbedingungen verabreicht wird. Die fettreiche Diät, auch als Western-Diät (Wilson et al. 2007) bezeichnet, besitzt mit 45 kcal% einen Fettanteil der mit dem durchschnittlichen Anteil der Fette in der Nahrung der westlichen Industrienationen vergleichbar ist. Der hohe Fettanteil entstammte dabei Schweineschmalz.

Bereits ab der 1. Woche zeigten die Tiere mit HF-Diät eine deutliche kontinuierliche Gewichtszunahme, die sich nach 14 Wochen bei den alten Tieren auf 10 % des Ausgangsgewichtes steigerte und bei den jungen Tieren eine mehr als 20%ige Zunahme ausmachte (Abb. 4-3). Die Gewichtszunahme war phänotypisch nach 6 Wochen kaum zu erkennen. In Abb. 4-1 sind repräsentative Tiere der jeweiligen Gruppen nach einem Zeitraum von 14 Wochen Versuchsdauer dargestellt. Deutlich ist hier die starke Gewichtszunahme in den HF-Gruppen zu sehen (Abb. 4-1).

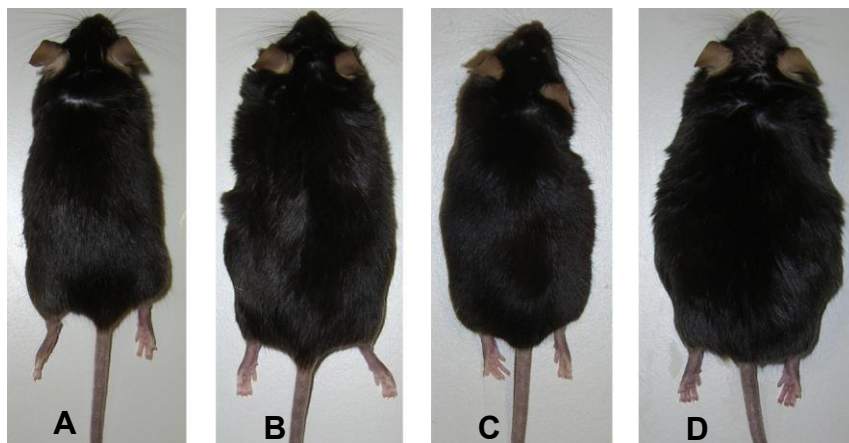


Abbildung 4-1 ausgewählte Tiere der einzelnen Gruppen nach 14 Wochen Fütterung der fettreichen Diät ; **A** –HD jung, **B** – HF jung, **C** - HD alt, **D** – HF alt

Um Unterschiede in der täglichen kcal-Aufnahme als Ursache der Gewichtszunahme nachweisen zu können, wurde die aufgenommene Futtermenge täglich notiert und die Tiere wöchentlich gewogen. In Abb. 4-2 ist vergleichend der Gewichtsverlauf jeweils der Gruppe junger (Abb. 4-2 A) und alter (seneszenten) Tiere (Abb. 4-2 B) wöchentlich für den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Da die aufgenommene kcal-Menge

nur geringfügig mit dem Fettanteil in der Nahrung auf durchschnittlich 1,5 - 2 kcal/d zunahm (nicht dargestellt), ist diese als Ursache für die Gewichtszunahme auszuschließen.

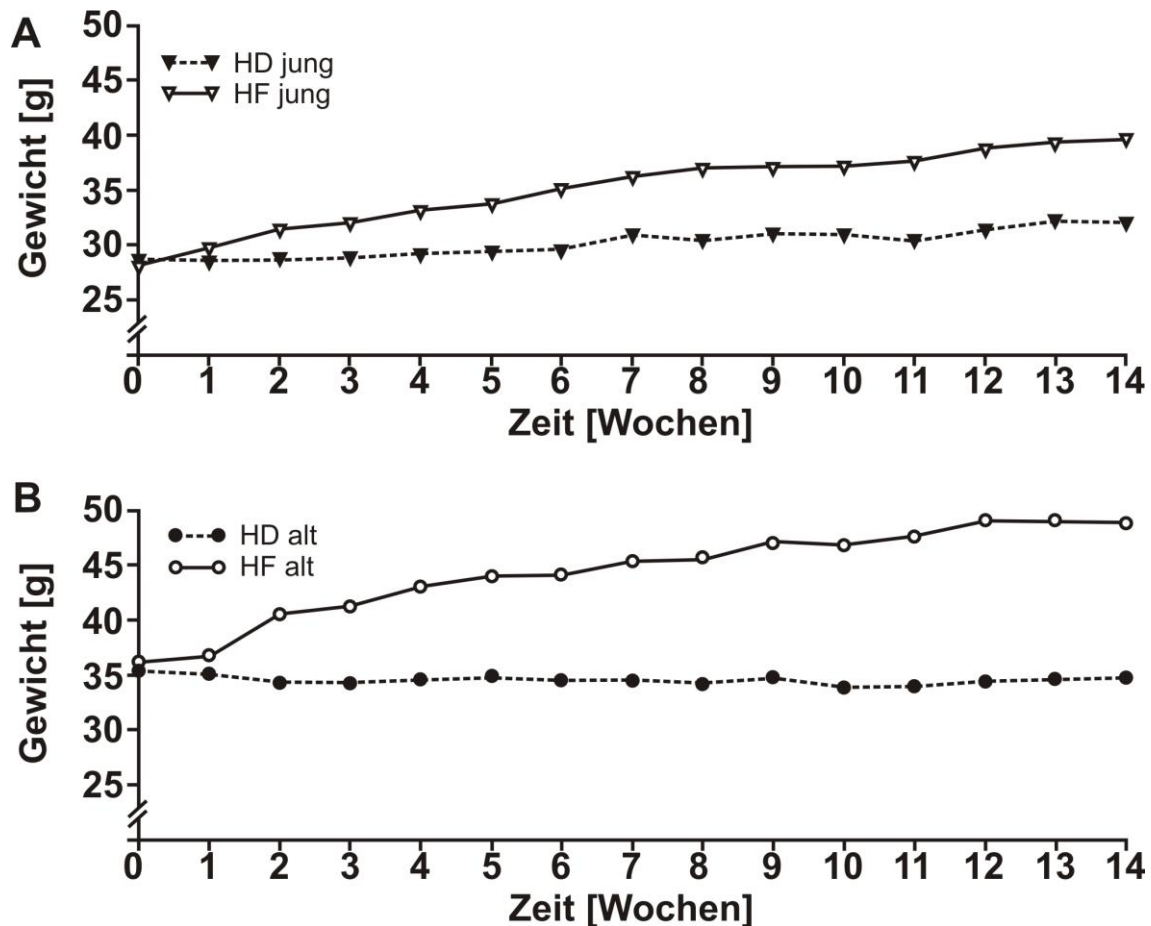


Abbildung 4-2 zeitlicher Verlauf des Körpergewichtes der Gruppen HD und HF

A – junge Tiere; B – alte Tiere. Eingerechnet sind sowohl die Daten der 6 als auch der 14 Wochen analysierten Tiere (bis Woche 6 n = 15 (alt) und n = 12 (jung); ab der 7. Woche n = 8 (alt) und n = 6 (jung)).

Bei den alten Kontrolltieren (HD) beobachteten wir während des Versuchszeitraumes einen Verlust von nahezu 5 % des Ausgangsgewichts. Diese rückläufige Gewichtsentwicklung ab einem Alter von ca. 16 - 18 Monaten ist als normale Alterungserscheinung aus der Literatur bekannt (Hamrick et al. 2006). Auch die alten Tiere der HF-Gruppe zeigten nach 14 Wochen der fettreichen Fütterung und einem Alter von 19 Monaten eine Stagnation hinsichtlich ihres Gewichtes. Entsprechend ihres Alters wiesen die jungen Tiere sowohl der HD- als auch der HF-Gruppe eine ihrer Wachstumsphase entsprechende konstante Zunahme an Gewicht auf (Abb. 4-2). In der Gruppe der jungen Tiere (6 - 8 Monate zum Studienende) lag die aufgenommene

kcal-Menge der Kontrollgruppe bei $9,94 \pm 0,32$ kcal und bei den Tieren der HF-Gruppe bei $11,97 \pm 0,47$ kcal. Die seneszenten Tiere (22 Monate zum Studienende) der Kontrollgruppe nahmen durchschnittlich $11,19 \pm 0,70$ kcal und die der HF-Gruppe $14,96 \pm 0,32$ kcal auf.

Anhand des wöchentlichen Mittels der aufgenommenen Kalorienmenge (nicht gezeigt) wird deutlich, dass die Zunahme an Körpergewicht auf den gesteigerten Fettanteil der Nahrung und nicht auf eine gesteigerte kcal-Aufnahme zurückzuführen ist.

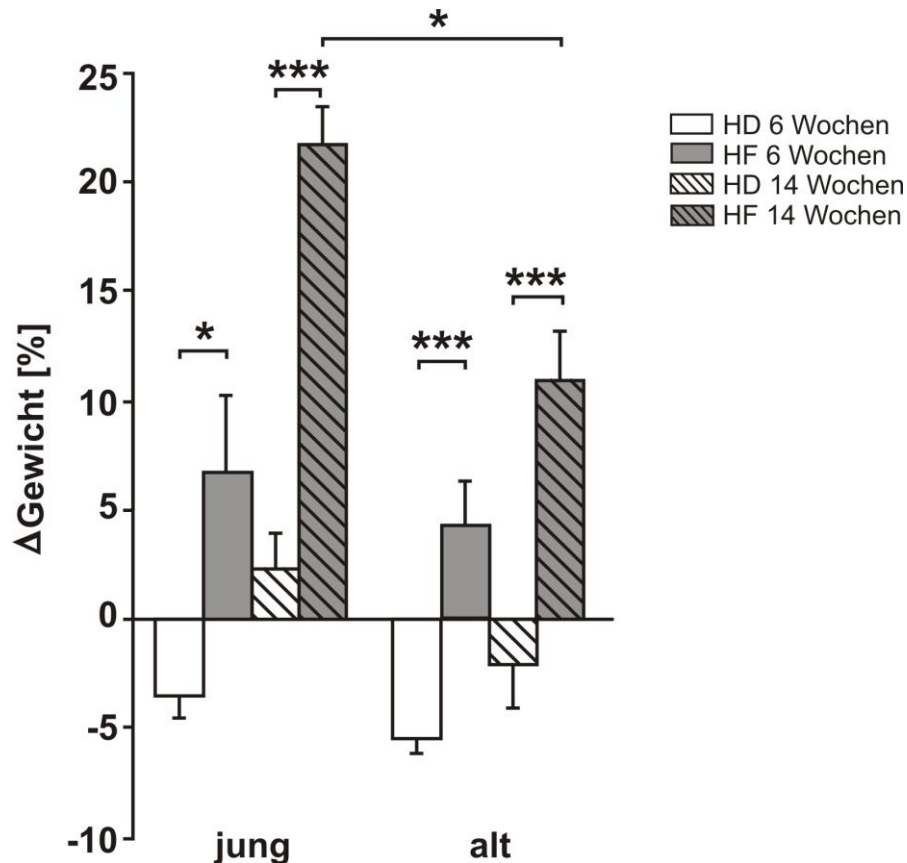


Abbildung 4-3 Vergleich der durchschnittlichen Endgewichte der einzelnen Gruppen: dargestellt als prozentuale Änderung bezogen auf das Ausgangsgewicht (alte Tiere n = 7 (6 Wochen) und n = 8 (14 Wochen); junge Tiere n = 6 (6 und 14 Wochen))

In Abb. 4-3 sind die Änderungen des Gewichtes der Tiere als prozentualer Anteil, bezogen auf das Ausgangsgewicht, dargestellt. Alte wie junge Tiere der HD-Gruppen zeigten nach 6 Wochen Versuchsverlauf eine negative Gewichtsentwicklung. Dieser Gewichtsverlust der Tiere ist möglicherweise durch den Wechsel der Haltungsbedingungen zu erklären. Um für jedes einzelne Tier eine exakte Bestimmung der Futtermenge über den gesamten Versuch zu ermöglichen, wurden die Tiere zu

Beginn des Versuchs aus Gemeinschaftshaltung in Einzelhaltung überführt. Nach 14 Wochen unter fettreicher Diät hatten die alten Tiere ihr Gewicht um $10,9 \pm 2,28 \%$ und die jungen Tiere um $21,73 \pm 1,71 \%$ gesteigert. Als Folgen der Lipidbelastung vermuteten wir eine gesteigerte Akkumulation von Triglyceriden in den Organen. Das Gewicht der einzelnen Organe ist in Tab. 4-1 aufgeführt.

Tabelle 4-1 durchschnittliche Organgewichte nach 6 und 14 Wochen unter fettreicher Diät; statistische Signifikanzen angegeben als (*) < 0,05; (**) < 0,01; (***) < 0,001 jung vs. alte Tiere der entsprechenden Gruppe (6 bzw. 14 Wochen) (#) < 0,05; (##) < 0,01; (###) < 0,001 HD-Gruppe vs. HF-Gruppe gleichen Alters (KG – Körpergewicht)

6 Wochen	HD jung	HF jung	HD alt	HF alt
Linker Ventrikel [mg]	101,33 \pm 3,51	100,33 \pm 5,17	124,43 \pm 4,49 **	121,00 \pm 2,51 **
Linker Ventrikel [mg] /KG [g]	3,74 \pm 0,18	3,03 \pm 0,17 #	3,83 \pm 0,12	2,98 \pm 0,18 ##
Linker Ventrikel [mg] /Tibia [mm]	6,61 \pm 0,24	6,58 \pm 0,32	7,47 \pm 0,29 *	7,90 \pm 0,32 **
Rechter Ventrikel [mg]	19,83 \pm 1,38	22,5 \pm 1,89	21,14 \pm 0,83	23,57 \pm 0,65
Leber [mg]	964 \pm 65	1116 \pm 111	1235 \pm 28 **	1402 \pm 182
Körpergewicht	27,25 \pm 1,00	33,77 \pm 2,72 #	32,57 \pm 1,02	41,43 \pm 2,17 ##

14 Wochen	HD jung	HF jung	HD alt	HF alt
Linker Ventrikel [mg]	101,50 \pm 3,40	100,50 \pm 2,67	134,25 \pm 5,38 ***	120,50 \pm 4,12 **
Linker Ventrikel [mg] / KG [g]	3,41 \pm 0,06	2,69 \pm 0,13 ###	4,07 \pm 0,18 *	2,65 \pm 0,10 ###
Linker Ventrikel [mg] / Tibia [mm]	4,84 \pm 0,16	4,71 \pm 0,12	6,36 \pm 0,25 ***	5,64 \pm 0,17 **/#
Rechter Ventrikel [mg]	22,17 \pm 1,60	26,00 \pm 2,03	24,13 \pm 0,79	23,63 \pm 0,94
Leber [mg]	1181 \pm 74	1294 \pm 248	1473 \pm 82 *	1643 \pm 126
Körpergewicht	29,80 \pm 1,29	37,98 \pm 2,56	33,13 \pm 0,88	42,73 \pm 1,69 ###

Wie in Tab. 4-1 zu sehen ist, unterschieden sich die Gewichte der verschiedenen Organe zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen der jungen oder alten Tiere kaum. So findet man tendenziell für die Leber ein leicht gesteigertes durchschnittliches Gewicht bei jungen wie alten Tieren der HF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auffällig ist der Unterschied zwischen jungen und alten Tieren betrachtet man die HD-Gruppen. Alte Tiere weisen einen deutlich schwereren linken Ventrikel (LV) und eine schwerere Leber auf.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wäre unter dem Einfluss lipidangereicherter Diät auch eine Gewichtszunahme des Herzens bzw. des linken Ventrikels (LV) aufgrund einer myokardialen Lipidakkumulation denkbar. Interessanterweise konnte keine Zunahme des LV-Gewichtes der Tiere der HF-Gruppe beobachtet werden. Mögliche Kollageneinlagerungen mit zunehmendem Alter der

Tiere wurden mittels Analyse der Expression kollagenkodierender Gene (4.3) untersucht. Um die Ursache des erhöhten Gewichtes der Leber der HF-Gruppe gegenüber den Kontrollen zu definieren, wurde von diesem Gewebe der Anteil an Triglyceriden und freien Fettsäuren bestimmt (4.2) sowie Färbungen des Lebergewebes mit Oil Red O durchgeführt (4.2). Eine mit zunehmendem Alter denkbare Fibrosierung und Hypertrophierung des LV wurde ebenfalls mittels histologischer Färbung untersucht (4.3).

4.2 Nachweis der Triglyceride und freien Fettsäuren

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit des linksventrikulären Materials wurden die histologischen Untersuchungen am LV-Gewebe an ausgewählten Proben exemplarisch durchgeführt (Abb. 4-4). Auffällig ist, dass im LV junger Tiere keinerlei intrazelluläre Lipideinlagerungen unter fettreicher Diät nachweisbar sind. Dagegen sind im LV der alten Tiere unter HF-Diät deutlich die eingelagerten Lipide, angefärbt mittels OilRedO, sichtbar. Das mikroskopische Bild ist vergleichbar mit den mikroskopischen Färbungen der *ob/ob*-Tiere in Abb. 4-5, die aufgrund einer Mutation einen adipösen Phänotyp entwickeln. Ursache bei diesen Tieren ist eine Punktmutation im *ob*-Gen (*ob* - obesity), welches für das regulierende Hormon Leptin kodiert. Dies führt bei den Tieren zu einem beständigen Hungergefühl und beständiger Nahrungsaufnahme. Ergebnis ist ein stark adipöser Phänotyp mit Fetteinlagerung in jeglichem Gewebe, auch dem LV. In Abbildung 4-5 ist im linksventrikulären Gewebe deutlich die Fetteinlagerung bei diesen Tieren in Form kleiner Lipidtröpfchen in den Kardiomyozyten nachweisbar.

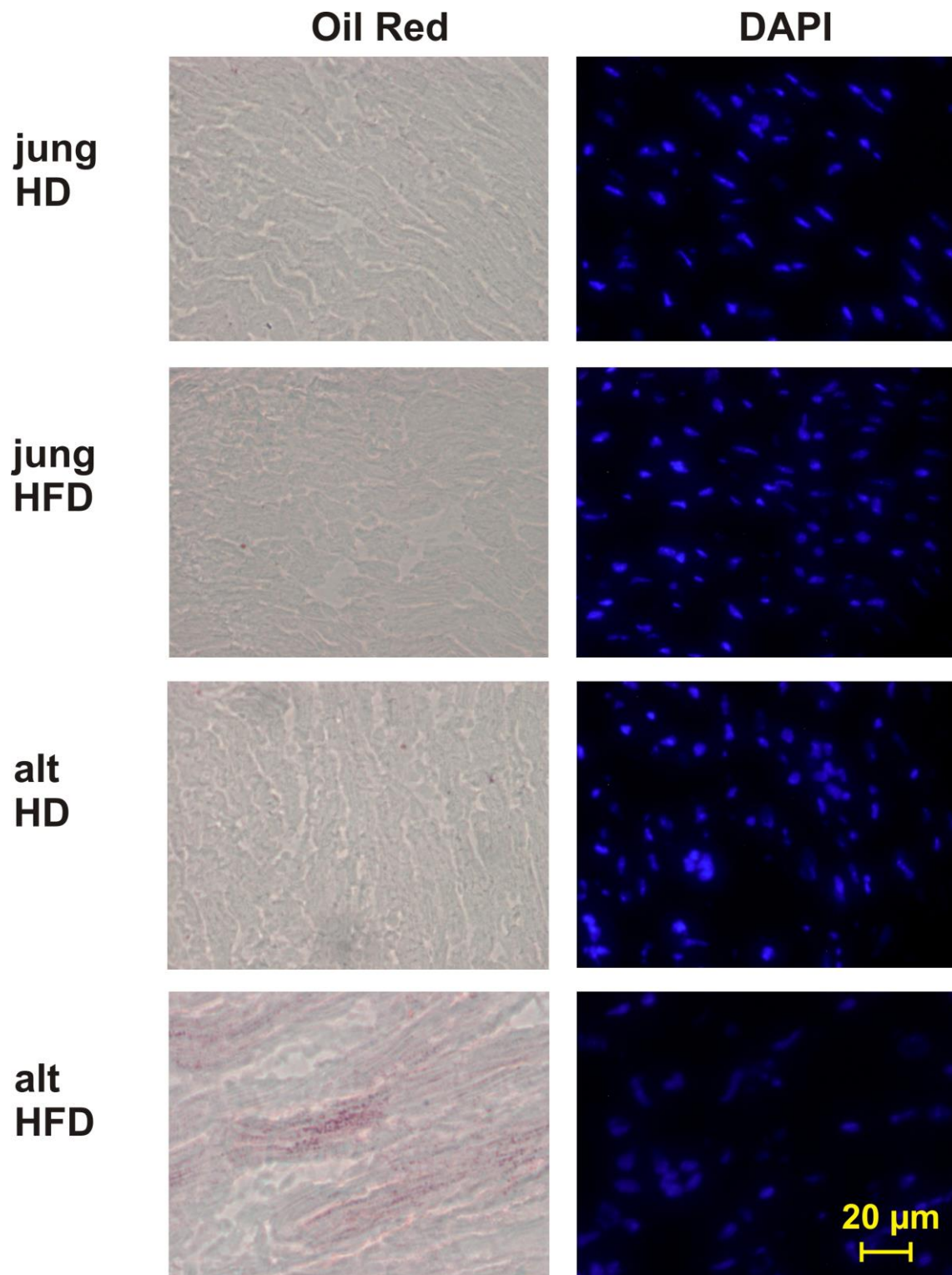


Abbildung 4-4 Oil Red O-Färbung von Fetteinlagerung im LV; Zellkerne mit DAPI angefärbt

Zusätzlich zu der in Abb. 4-4 nachweisbaren Lipideinlagerung im LV der alten Tiere weisen die Myozyten auch eine deutliche Hypertrophierung auf. Eine Auswertung der Zelldurchmesser (4.3.1) bestätigt diese Vermutung.

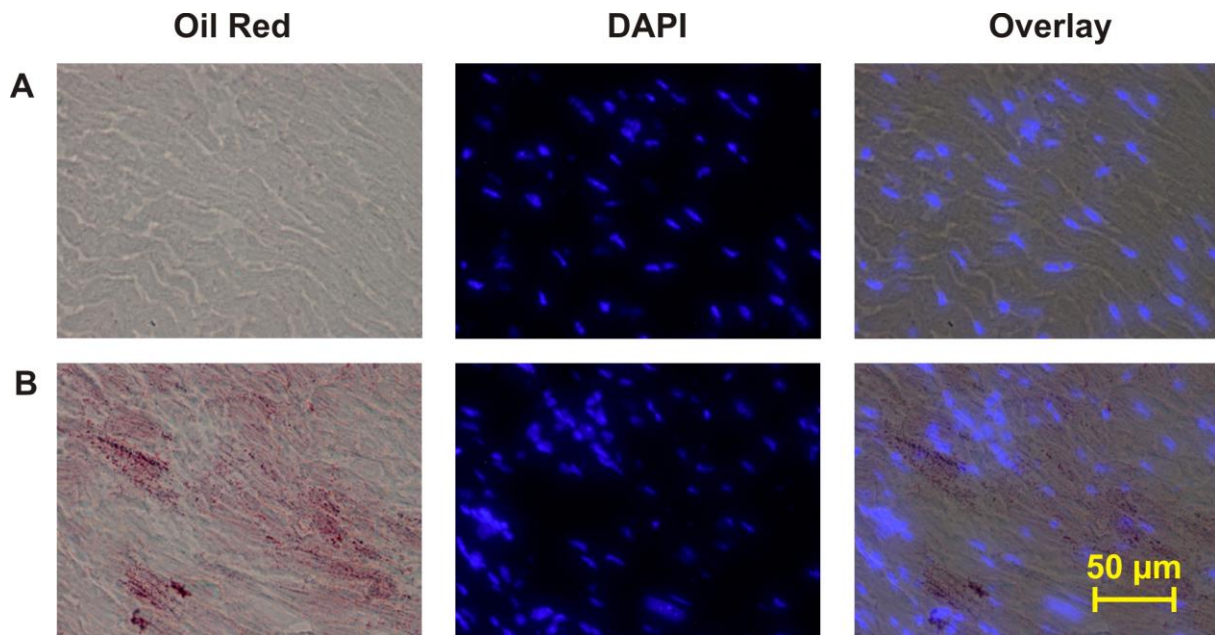


Abbildung 4-5 Oil Red O-Färbung von Kardiomyozyten des linken Ventrikels von A – WT- und B - ob/ob-Tieren; rot angefärbt mit Oil Red O sind intrazelluläre Lipidtröpfchen, blau angefärbt mit DAPI sind Zellkerne

Parallel zu diesen Untersuchungen führten wir außerdem Färbungen an Lebergewebe durch (nicht gezeigt), da die Leber neben dem Fettgewebe das primäre Zielorgan metabolischer Adaptation bei Fettbelastung ist. Zur Überprüfung einer möglichen Einlagerung von Triglyceriden wurden Kryoschnitte des Gewebes angefertigt und ebenfalls mit Oil Red O gefärbt. Auch hier ist deutlich eine verstärkte Einlagerung von Lipiden in Form vergrößerter Fetttröpfchen in den Hepatozyten der fettreich gefütterten Tiere zu beobachten.

Neben der mikroskopischen Analyse der Einlagerung von Fetten in LV und Leber untersuchten wir den Gehalt von Lipiden (TRI) und freien Fettsäuren (NEFA) im Serum. Die Untersuchungen zeigen hier bereits nach 6 Wochen einen Anstieg der Triglyceride und freien Fettsäuren im Serum sowohl der alten als auch der jungen Tiere der HF-Gruppe (Abb. 4-6).

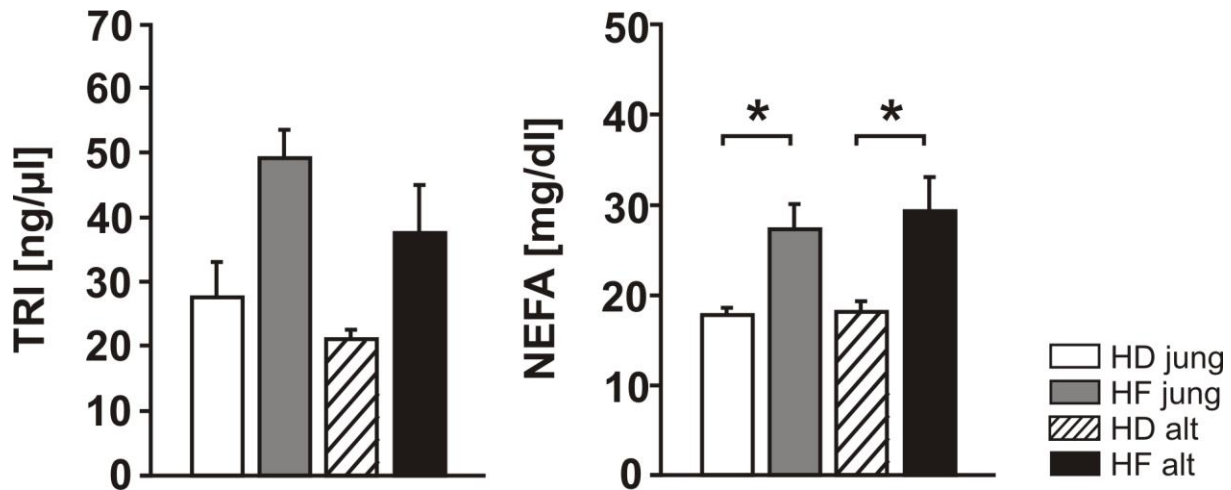


Abbildung 4-6 Triglyceride und freie Fettsäuren im Serum; nach 6 Wochen Versuchsdauer (n = 3 alte und n = 3 junge Tiere)

Eine Analyse der Serumwerte nach 14 Wochen fettreicher Nahrung wies keinen weiteren Anstieg des Triglycerid- und Fettsäuregehaltes auf.

Im linksventrikulären Gewebe finden wir das gleiche Bild. Der hohe Fettanteil in der Diät führt zu einem signifikant erhöhten Anteil an freien Fettsäuren (junge und alte Tiere) und Triglyceriden (junge Tiere) im Gewebe (ohne Abbildung).

Basierend auf den mikroskopischen Analysen können wir eine verstärkte Einlagerung von Fetten in LV und Leber nachweisen und damit auch die Gewichtszunahme der Organe in den HF-Gruppen aufklären. Die erhöhten Triglycerid- und NEFA-Spiegel im Serum und LV deuten zudem auf eine lipotoxische Auswirkung der fettreichen Diät hin. Um die Auswirkungen auf die kardiale Funktion zu charakterisieren, untersuchten wir mittels transthorakaler echokardiographischer Analyse die Tiere und verglichen die Gruppen untereinander (4.3.)

4.3 Charakterisierung der ventrikulären Funktion

Der transthorakalen, echokardiographischen Analyse der Herzfunktion wurden die Tiere nach 6 und 14 Wochen Versuchsdauer unterzogen. Die echokardiographische Auswertung der Daten nach 6 Wochen zeigt keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Die hier dargestellten Daten der ventrikulären Funktion beziehen sich daher nur auf die Messwerte nach 14 Wochen Versuchsdauer.

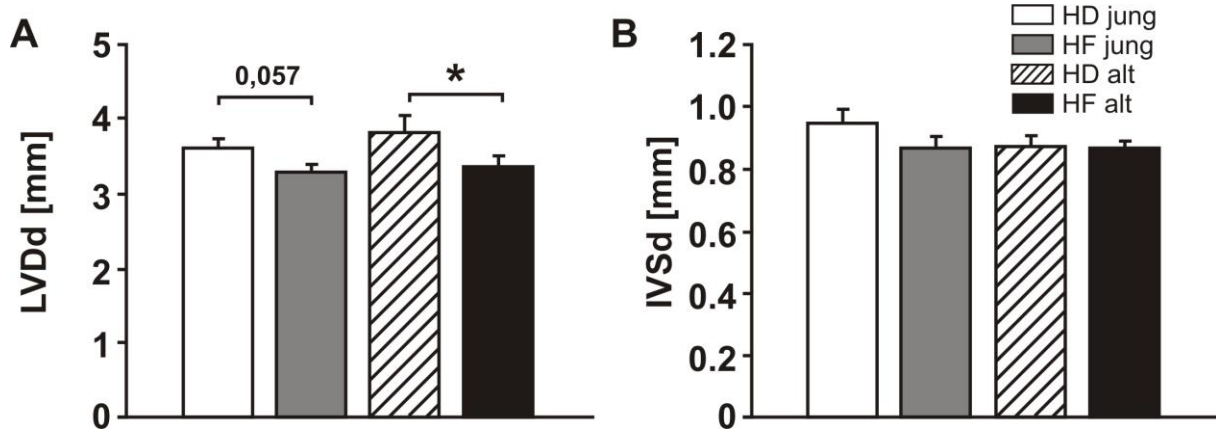


Abbildung 4-7 Vergleich des Innendurchmessers des linken Ventrikels (LVDd) und der Dicke des interventrikulären Septums (IVSd) in der Diastole nach 14 Wochen Versuchsdauer (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Eine Fütterung der Tiere über 14 Wochen mit fettreicher Nahrung zeigt keine Auswirkungen auf die echokardiographisch bestimmte Wandstärke des interventrikulären Septums (IVSd). Beide Gruppen (jung und alt) weisen unter fettreicher Fütterung eine signifikante Verringerung des Innendurchmessers des linken Ventrikels (LVDd) auf. Das heißt, dass der linke Ventrikel nicht mehr in der Lage ist, sich im Entspannungszustand entsprechend weit zu dehnen. Dies hat zur Folge, dass das in den Ventrikel aufgenommene Blutvolumen verringert ist.

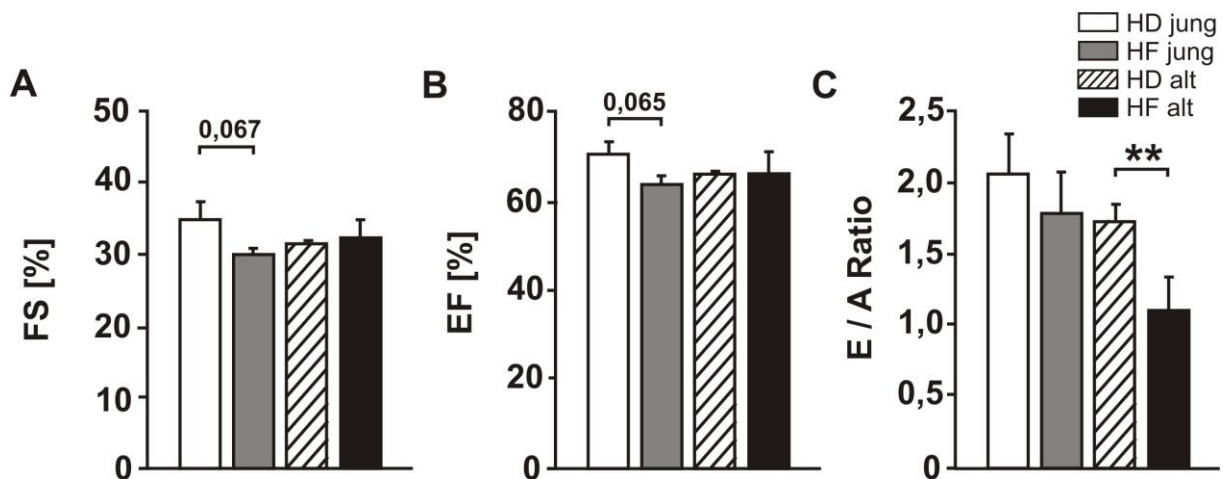


Abbildung 4-8 Darstellung von Parametern der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion nach 14 Wochen Versuchsdauer A – fraktionale Verkürzung (FS fraction shortening) als beschreibende Größe für die prozentuale Verkürzung der Herzkammer (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere); B – Auswurf fraktion (EF-ejection fraction) (beinhaltet das Verhältnis aus Schlagvolumen und enddiastolischem Volumen); C – E/A-Ratio (Ratio aus early filling und atrial contraction)

Sowohl die Auswurfraction (EF) als auch das Fractional Shortening (FS) sind in der HF-Gruppe der jungen Tiere leicht gegenüber der Kontroll-Gruppe (Abb. 4-8 A und B) reduziert. Dagegen finden wir in den alten Tieren unveränderte Werte für FS und EF unter dem Einfluss der fettreichen Diät. Jedoch zeigt sich im Quotient der E- und A-Welle des mitralen Dopplerspektrums eine signifikante Verringerung bei den alten Tieren unter fettreicher Nahrung. Zusammen mit einem verringerten LVDd (Abb. 4-7) weist die verringerte E/A-Ratio der alten Tiere auf eine eingeschränkte Relaxation des linken Ventrikels unter fettreicher Diät nach einer Versuchsdauer von 14 Wochen hin.

Um zu untersuchen, ob die Veränderung der diastolischen LV-Parameter auf eine verstärkte Kollageneinlagerung oder einen verminderten Kollagenabbau im Gewebe zurückzuführen ist, wurden die Gene Col1A1 und Col3A1 auf ihre Expression untersucht.

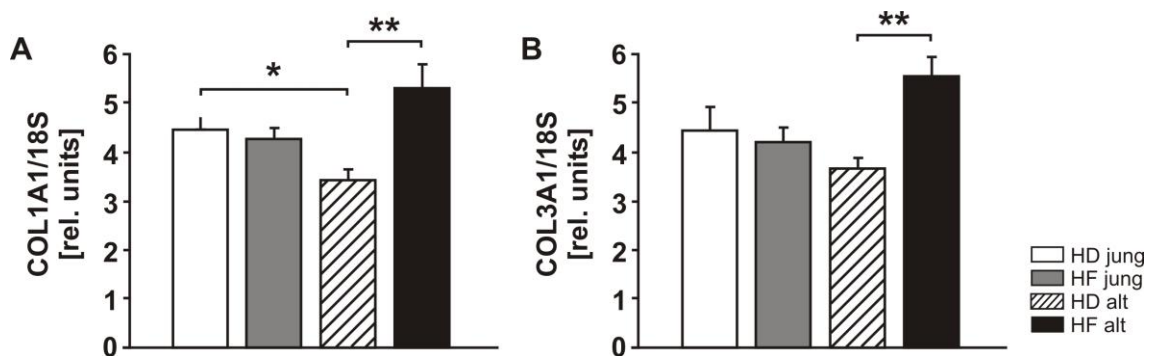


Abbildung 4-9 Expressionsanalyse der Kollagen-kodierenden Gene COL1A1 (A) und COL3A1 (B) im linken Ventrikel nach 6 Wochen Versuchsdauer (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Nach 6 Wochen Fütterung fettreicher Diät können wir einen deutlichen Expressionsanstieg der Gene in der HF-Gruppe der alten Tiere nachweisen (Abb. 4-9 A und B), der im weiteren Versuchsverlauf keine weitere Steigerung zeigt (ohne Abb.). Dagegen unterscheidet sich die Kollagenexpression der jungen Tiere der HF-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren, sowohl nach 6 als auch nach 14 Wochen, nicht. Die im LV der alten Tiere der HF-Gruppe nachgewiesene Expressionsinduktion resultiert in einer deutlich sichtbaren Einlagerung von Kollagen im Gewebe. Dies bestätigen Färbungen von Gewebeproben des linken Ventrikels. Abb. 4-10 zeigt repräsentative Färbungen aller Gruppen. Deutlich ist die verstärkte Kollageneinlagerung im Gewebe der alten Tiere der HF-Gruppe nach 14 Wochen Versuchsdauer zu sehen.

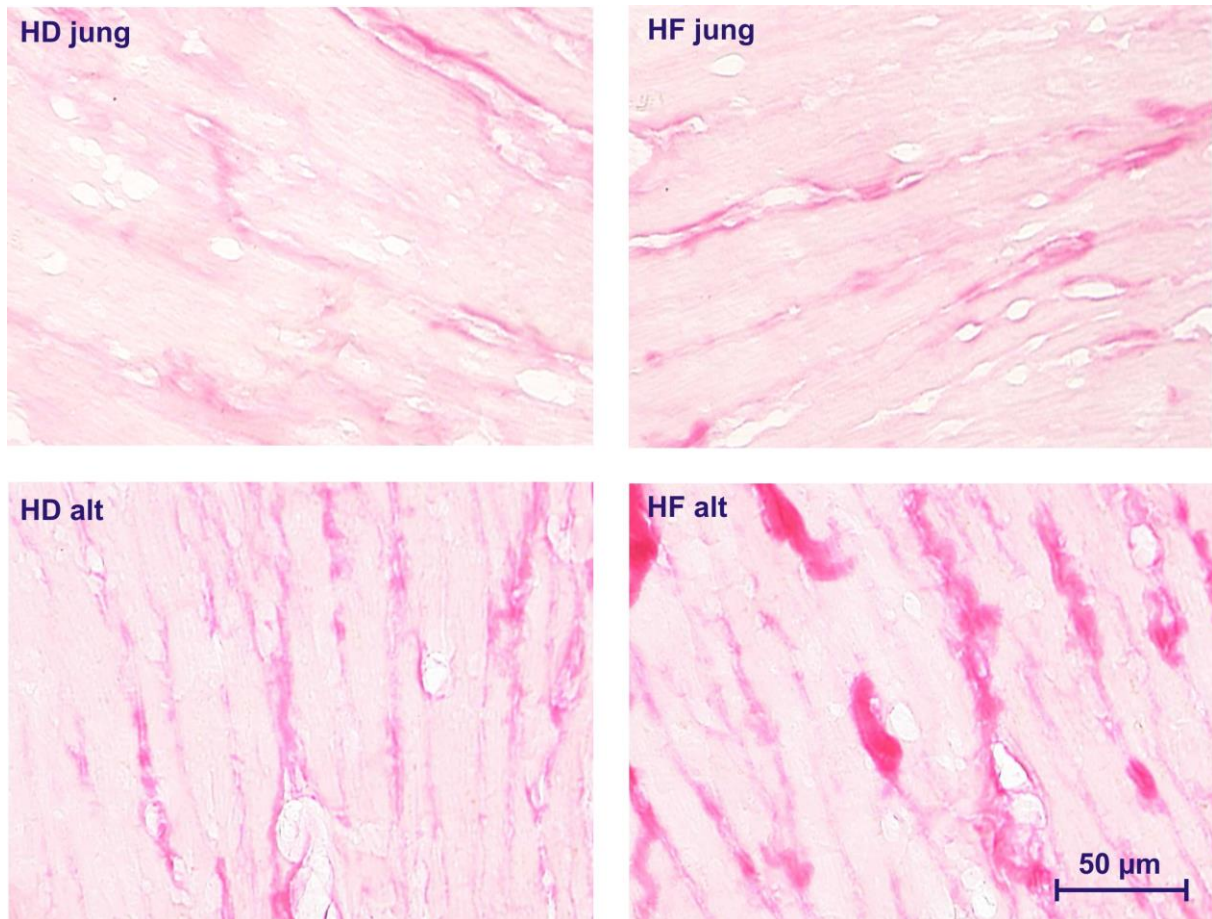


Abbildung 4-10 Siriusrot-Färbung von Gewebeproben des linken Ventrikels nach 14 Wochen Versuchsdauer

Zur Beschreibung der kardialen Funktion wurden außerdem Gene untersucht, die im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz als sogenannte Überlast-induzierte Marker dienen. So gilt insbesondere ein Anstieg des im Plasma zirkulierenden Brain natriuretic Peptide (BNP) als zuverlässiger Marker für Herzinsuffizienz (Mair et al. 2001). Daher wird BNP in der klinischen Routine zur Identifizierung und zur Verlaufskontrolle von Herzinsuffizienz genutzt. Neben BNP wird auch ANP (atriales natriuretisches peptid) bei Dehnungsreizen ausgeschüttet.

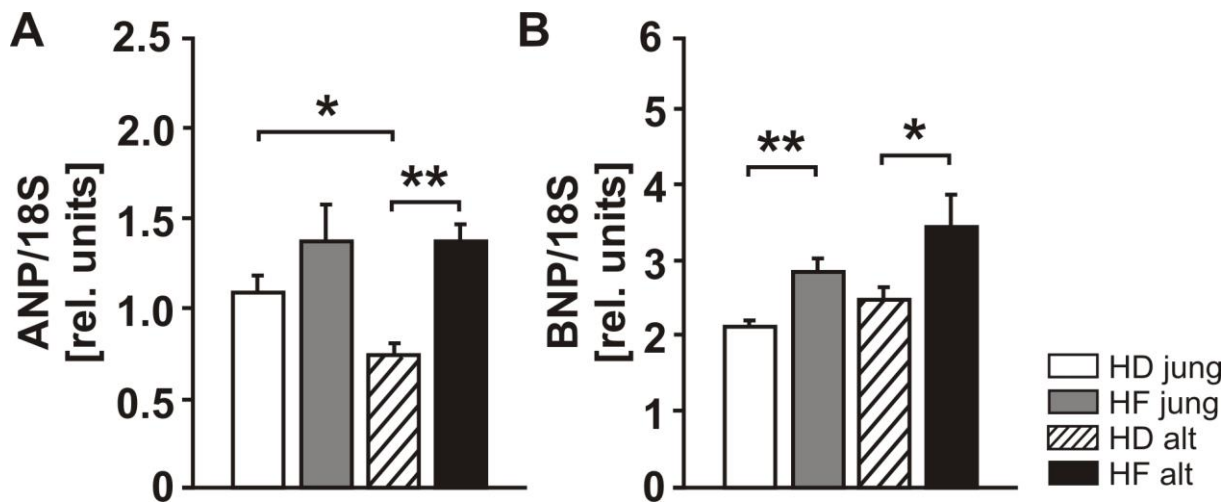


Abbildung 4-11 ANP (A) und BNP (B) als Indikatoren für Herzinsuffizienz - Expression nach 6 Wochen fettreicher Diät (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Beide Gene, ANP und BNP, zeigen bereits nach 6 Wochen einen deutlichen Anstieg der Expression in den linken Ventrikeln der Tiere der HF-Gruppe beider Altersgruppen (Abb. 4-11), welcher sich im weiteren Versuchsverlauf nicht steigert (ohne Abb.). Die moderat gesteigerte Expression beider Peptide im LV der Tiere der HF-Gruppen (jung und alt) könnte somit auf eine beginnende Herzinsuffizienz hindeuten.

Die Expression der Calcium-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) wird ebenfalls häufig zur Charakterisierung chronischer Herzschwäche und ventrikulärer Dysfunktion verwendet (Hasenfuss et al. 1994).

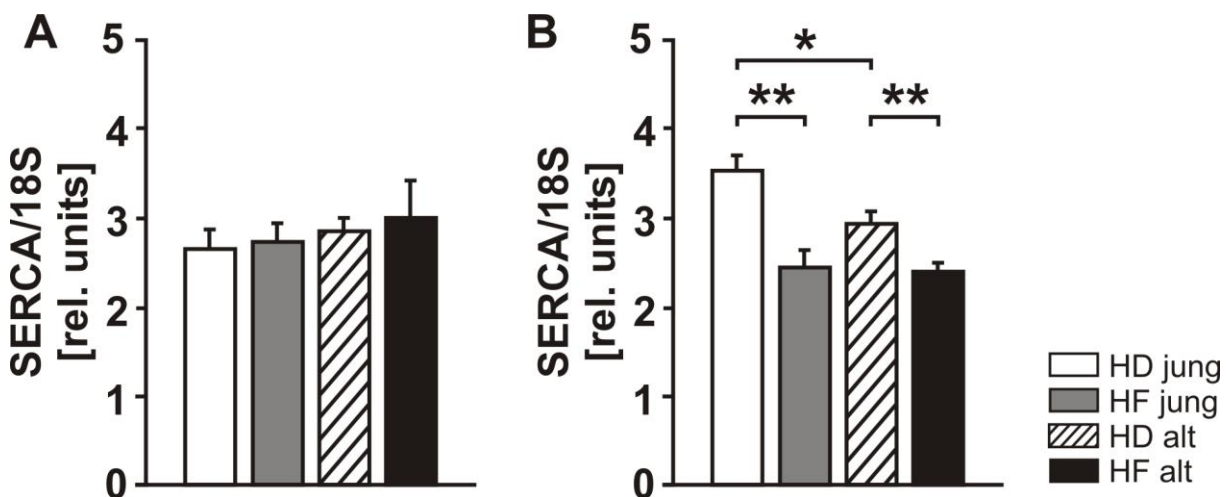


Abbildung 4-12 SERCA als Indikator für die Endphase chronischer Herzinsuffizienz - Expression nach 6 (A) und 14 (B) Wochen fettreicher Diät (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Nach 6 Wochen Versuchsdauer ist keinerlei Veränderungen in der Expression der Ca^{2+} -ATPase nachweisbar. Jedoch ist nach 14 Wochen eine signifikante Reduktion der Expression in beiden Altersgruppen unter fettreicher Diät zu verzeichnen (Abb. 4-12). Zudem weisen die alten Tiere der Kontrollgruppe eine reduzierte Expression im Vergleich zu den jungen Tieren der Kontrollgruppe auf. Dies spricht für eine mit zunehmendem Alter einsetzende chronische Herzschwäche, die unter dem Einfluss fettreicher Nahrung zusätzlich verstärkt wird.

4.3.1 Bestimmung der zellulären Hypertrophie (cross sectional area)

Der mit zunehmendem Alter nachgewiesene Untergang von Kardiomyozyten durch Nekrose und Apoptose induziert eine reaktive Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten sowie eine gesteigerte Inflammation und Proliferation von Fibroblasten mit konsekutiver Fibrosierung (Olivetti et al. 1991).

Um zu analysieren, ob die fettreiche Diät einen Einfluss auf diese alterstypische Erscheinung hat, wurde an Kryoschnitten des linksventrikulären Gewebes die zelluläre Hypertrophie der Kardiomyozyten untersucht. Hierzu wurden Kryoschnitte linksventrikulären Gewebes mit Lectin-TRITC (Zellmembran) und DAPI (Zellkerne) gefärbt (Abb. 4-13) und die Zelldurchmesser bestimmt.

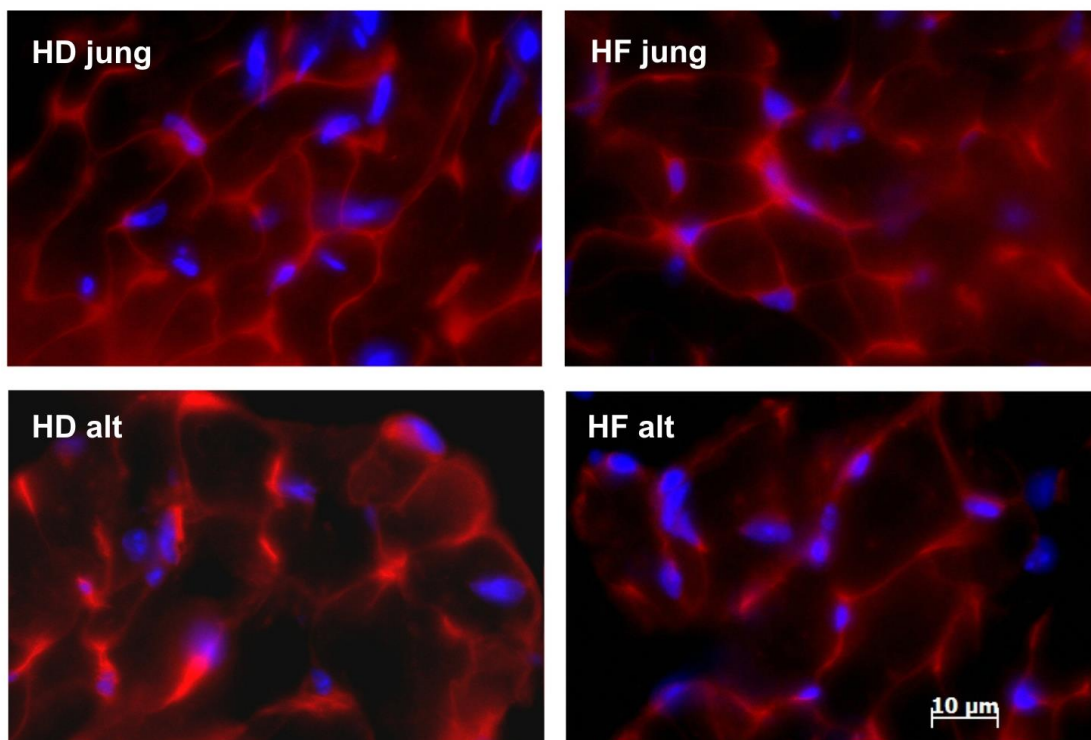


Abbildung 4-13 cross sectional area - repräsentative Aufnahmen von Lectin-TRITC/DAPI-Färbungen von Kryoschnitten linksventrikulärem Gewebes

Von den so angefärbten Zellen wurden die Zelldurchmesser ermittelt und die Zellfläche (cross sectional area, CSA) berechnet (Abb. 4-14). Diese Analyse weist eine Hypertrophie der Kardiomyozyten mit zunehmendem Alter der Tiere nach (Boyle et al. 2011).

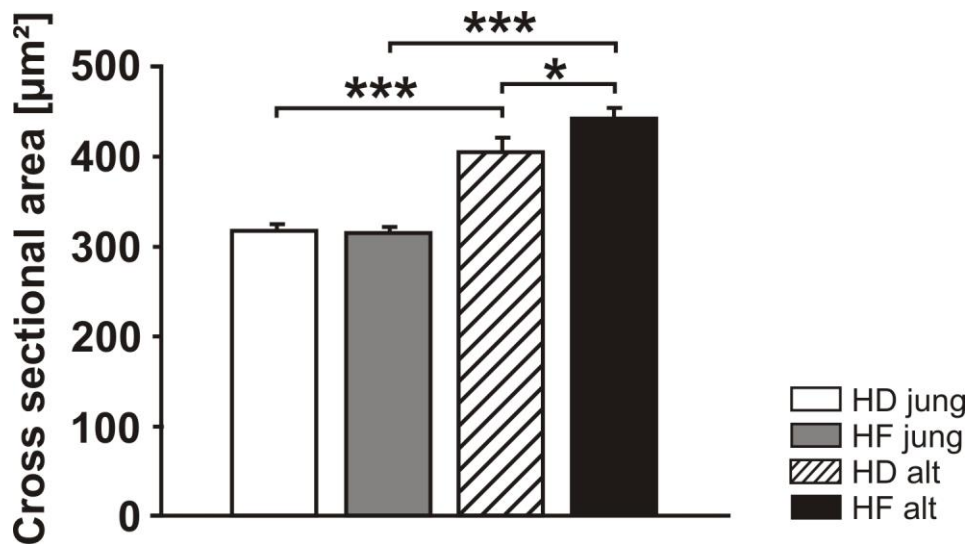


Abbildung 4-14 Auswertung cross sectional area – von Kryoschnitten Ventrikelgewebe der linken Herzkammer der alten (HD n = 4/HF n = 4) und jungen (HD n = 4/ HF n = 6) Tiere der HD- und HF-Gruppe nach 14 Wochen Versuchsdauer

Ein Einfluss der fettreichen Diät hinsichtlich einer Hypertrophie der Kardiomyozyten der jungen Tiere war nicht nachweisbar (Abb. 4-14). Dagegen wurde die alterassoziierte Hypertrophie der Kardiomyozyten der alten Tiere unter HFD weiter gesteigert (Abb. 4-14).

4.4 Stoffwechselanalyse

Um die Stoffwechselsituation der Versuchstiere und die damit verbundenen Auswirkungen auf das Myokard zu beschreiben, erfolgte eine Analyse verschiedener zentraler Gene des Fett- und Glucosestoffwechsels, wie PPARAlpha-Target-Gene (4.4.1), der Adiponektin-vermittelten AMPK-Aktivierung (4.4.2) sowie der mitochondrialen Funktion und Biogenese (4.4.3). Außerdem wurden von ausgewählten Genen auch Vergleichsanalysen in Leber und Skelettmuskel (M. gastrocnemius) durchgeführt, um Aussagen über systemische Effekte der HFD und altersassoziierte Adaptation zu ermöglichen.

4.4.1 Peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α) – Target-Gene

Ein erhöhter Anteil an langkettigen Fettsäuren in der Nahrung bewirkt eine Aktivierung von PPAR α und führt zu einer gesteigerten Expression seiner in vielfältigen Prozessen involvierten Target-Gene (Gilde et al. 2003). Hierzu zählen beispielsweise die Fettsäuretransporter CD36 in der Zellmembran (Brinkmann et al. 2002) und CPT1 in der Mitochondrienmembran der Kardiomyozyten. Neben dem Fettstoffwechsel werden durch PPAR α auch Gene des Glucosestoffwechsels betreffend die Glucose-Aufnahme in die Zelle (GLUT4) (Zheng et al. 2001; Barnes et al. 2002) oder die Glykolyse (PDK4) beeinflusst. Durch Aktivierung des Target-Gens PGC1 α beeinflusst PPAR α zudem die mitochondriale Biogenese (Daval et al. 2005). Dagegen verursacht die Expressionsinduktion von UCP2 und UCP3 eine mitochondriale Entkopplung (Young et al. 2001; Boudina et al. 2005; Okere et al. 2007).

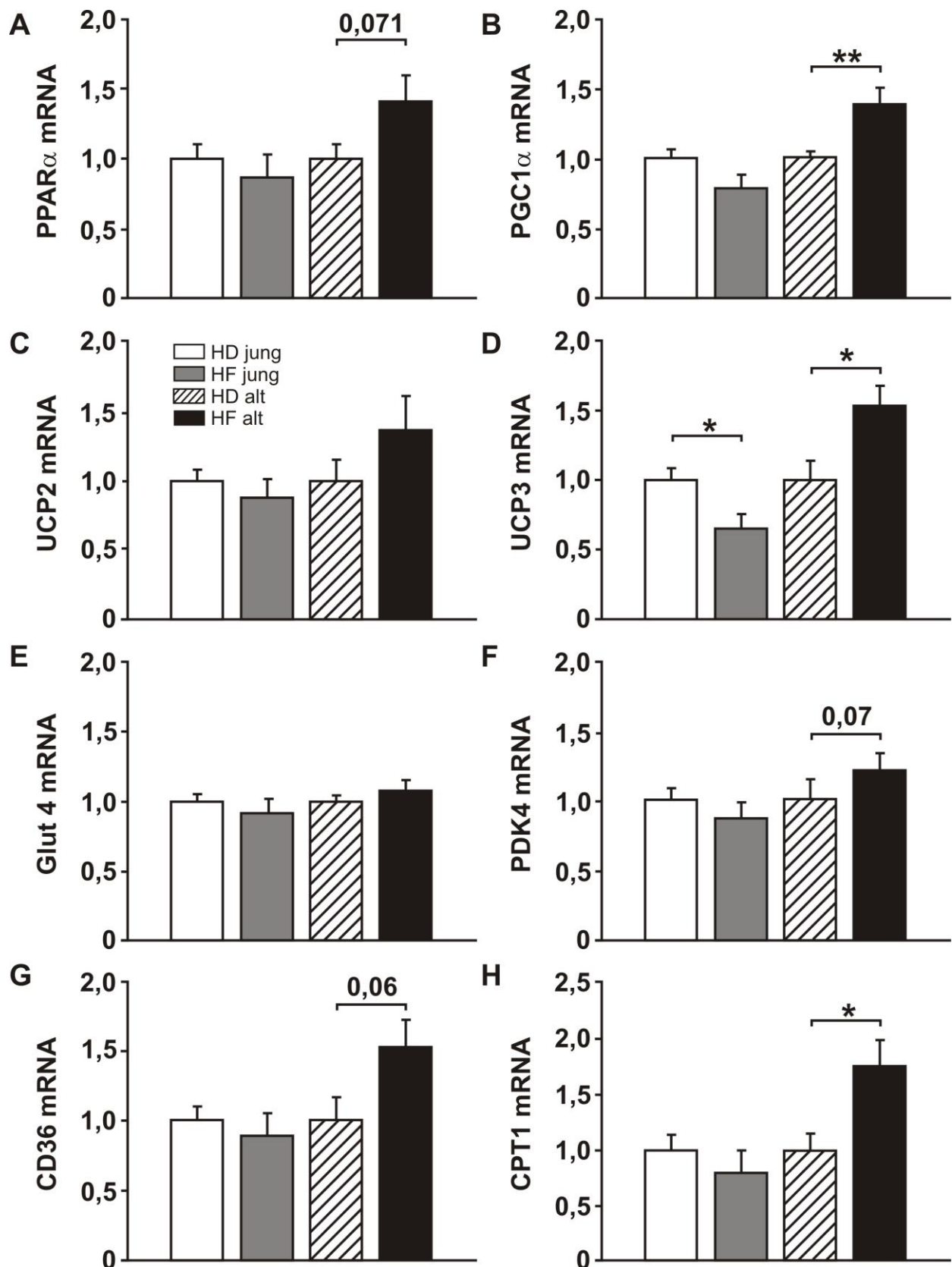


Abbildung 4-15 Expression von PPAR α (A) und dessen Target Gene (B-H) im linken Ventrikel nach 14 Wochen Versuchsdauer (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere), (Kontrollen normalisiert auf 1,0)

Betrachtet man die Ergebnisse nach 14 Wochen Versuchsdauer, dargestellt in Abb. 4-15, wird deutlich, dass die jungen und alten Tiere unterschiedlich auf den Einfluss der fettreichen Nahrung reagieren. Generell ist eine tendenzielle Expressionsinduktion von PPAR α und seinen Target-Genen im linken Ventrikel unter dem Einfluss fettreicher Diät der alten Tiere zu verzeichnen. So sind die Expression der Fettsäuretransporter CD36 und CPT1 gegenüber der HD-Gruppe signifikant induziert. Das gleiche Bild ist für PGC1 α , UCP3 und PDK4 zu sehen.

Im linken Ventrikel junger Tiere ist lediglich eine Reduktion der Expression von UCP3 statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe nachzuweisen. Die Expressionsmuster weiterer Target-Gene scheint in jungen Tieren unter fettreicher Diät unbeeinflusst.

4.4.1.1 Acyl-CoA-Thioesterasen

Die vorwiegend cytosolisch (Acot1) und mitochondrial (Acot2) vorliegenden Acyl-CoA-Thioesterasen werden auch als CTE1 und MTE1 bezeichnet und stellen weitere PPAR α -regulierte Gene dar. Thioesterasen zählen zu Genen des Fettstoffwechsels und katalysieren die Hydrolyse von Acyl-CoA-Thioestern zu freien Fettsäuren und CoASH.

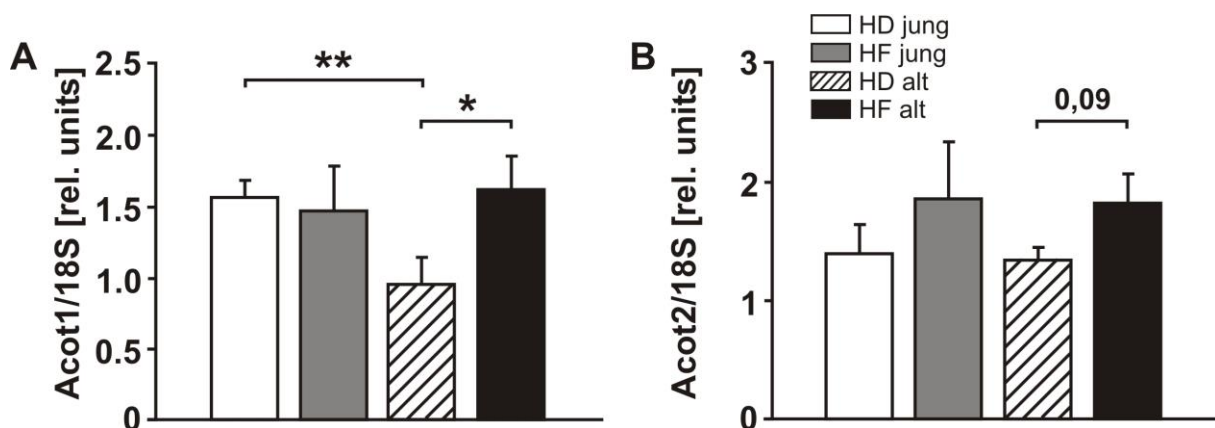


Abbildung 4-16 Expression von Acot1 (A) und Acot2 (B) im LV nach 14 Wochen Versuchsdauer (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Wie die Expressionsanalyse im linken Ventrikel der Mäuse nach 14 Wochen zeigt (Abb. 4-16), wird Acot1 in den alten Tieren in der HF-Gruppe induziert. Die Tiere der HD-Gruppe dagegen weisen eine niedrigere Expression als die jungen Tiere dieser Gruppe auf. In der Gruppe der jungen Tiere lässt sich unter fettreicher Nahrung kein Einfluss auf die Expression von Acot1 beobachten. Für Acot2 kann ebenfalls keine

signifikante Expressionsinduktion verzeichnet werden. Aber tendenziell ist eine Induktion unter fettreicher Nahrung nach 14 Wochen Versuchsdauer in der Gruppe der alten Tiere unter HF-Diät sehen.

4.4.1.2 Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Enzyme gelten als Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels. Die Acyl-CoA-Oxidase (ACO) katalysiert die Aktivierung der Fettsäuren im Zytosol zu Acyl-CoA-Fettsäuren. Die so aktivierten Fettsäuren werden mittels Carnithin-Shuttle in die mitochondriale Matrix transportiert und in der β -Oxidation verstoffwechselt. Für den ersten Schritt des Fettsäureabbaus ist die Acyl-CoA-Dehydrogenase zuständig, die in ihrer Aktivität der der Regulation durch PPAR α unterliegt (Huss and Kelly 2004; Stavinocha et al. 2004). Je nach Kettenlänge der zu oxidierenden Fettsäure unterscheidet man verschiedene Dehydrogenasen (z. B. MCAD vgl. 4.4.1.3). Ein weiteres wichtiges Enzym, die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), katalysiert mit der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA den limitierenden Schritt der Fettsäuresynthese. Mittels Phosphorylierung/ Dephosphorylierung wirkt die AMP-Kinase regulierend auf die Aktivität der ACC. Eine Aktivierung der AMPK resultiert dabei in einer Phosphorylierung/ Hemmung der ACC und führt somit zu einer verminderten Bildung an Malonyl CoA, was wiederum eine gesteigerte Fettsäureoxidation zur Folge hat (Dyck and Lopaschuk 2002).

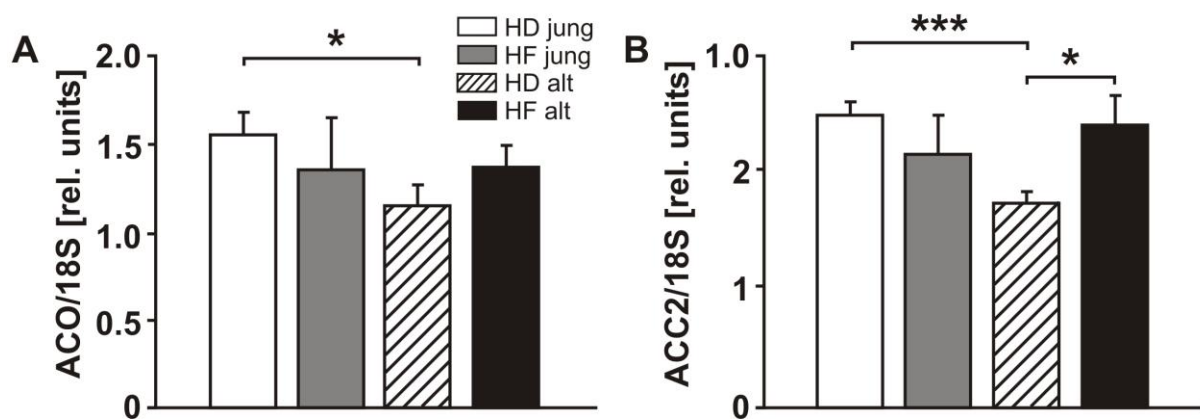


Abbildung 4-17 Expression von ACO und ACC2 im LV nach 14 Wochen Versuchsdauer; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Mit zunehmendem Alter der Tiere beobachten wir eine Expressionsverringern der ACO und ACC in den HD-Gruppen (vgl. Abb. 4-17). Der Fettstoffwechsel scheint in den alten Tieren damit herunterreguliert. Unter dem Einfluss einer fettreichen Diät

zeigen nur alte Tiere nach 14 Wochen Versuchsdauer eine signifikant gesteigerte Expression der ACC, nicht jedoch der ACO. Die Expression beider Enzyme wird im LV junger Tiere durch HF-Diät weder induziert noch herunterreguliert.

4.4.1.3 Ergebnisse der MCAD-Aktivität-Messung

Die mittelkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD) baut Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C4-C16 zu Acetyl- bzw. Propionyl-CoA ab, welche über den Citrat-Zirkel verstoffwechselt werden. Da die HF-Diät neben Oleat vorrangig Palmitat (C16) als Energiequelle enthält, ist die MCAD-Aktivität ein guter Indikator für die Beschreibung der Fettstoffwechselaktivität nach Verabreichen der HF-Diät.

Wie in Abb. 4-18 dargestellt, bewirkt die HF-Diät eine Steigerung der MCAD-Aktivität sowohl tendenziell in der Gruppe der jungen als auch signifikant in der Gruppe der alten Tiere. Die gesteigerte Aktivität (Abb. 4-18 A) nach 14 Wochen unter dem Einfluss fettreicher Kost könnte auf eine verstärkte β -Oxidation im linksventrikulären Gewebe hindeuten. Ursächlich für die erhöhte MCAD-Aktivität wiederum könnte die gesteigerte MCAD-mRNA-Expression sein (Abb. 4-18 B).

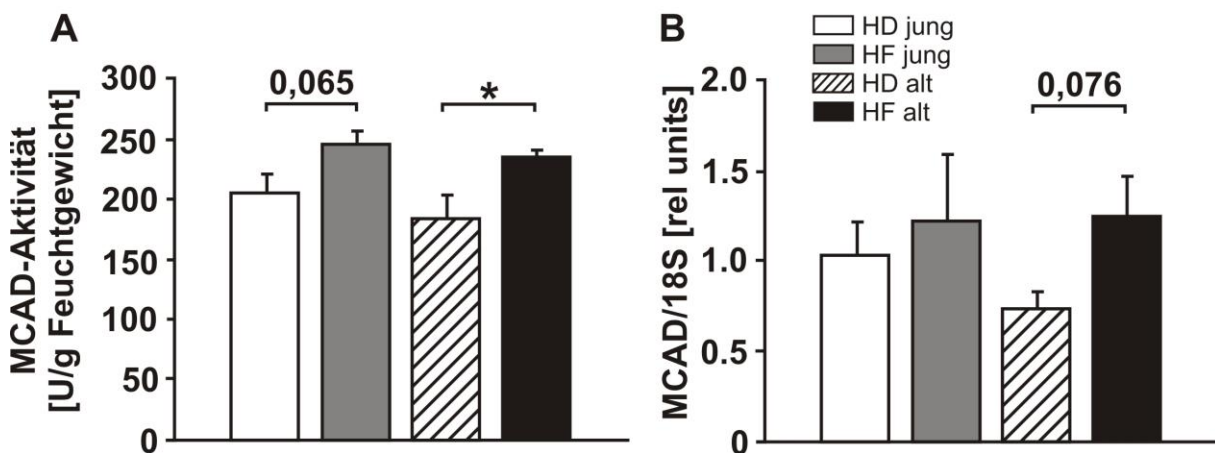


Abbildung 4-18 A - Aktivität von MCAD; B - Expressionsanalyse von MCAD; Die Daten wurden von LV-Gewebe erhoben nach 14 Wochen Fütterung von HF-Diät; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

4.4.1.4 Stearoyl-CoA-Desaturase

Die Stearoyl-CoA-Desaturasen gehören zu den Schlüsselenzymen der Synthese einfach ungesättigter Fettsäuren, wie Palmitoleyl- und Oleyl-CoA aus Palmitoyl- und Stearoyl-CoA (Ntambi 1999; Miyazaki and Ntambi 2003). Es sind vier Isoformen bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoformen SCD1 und SCD4 untersucht,

da SCD4 ausschließlich im LV nachgewiesen (Zheng et al. 2001) und SCD1 vorrangig in der Leber vorgefunden wurde (Flowers and Ntambi 2008).

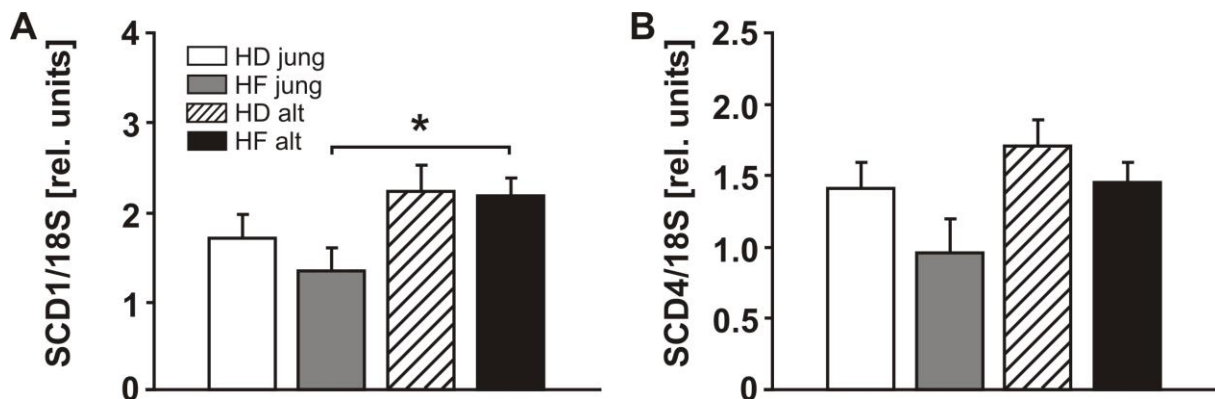


Abbildung 4-19 Expressionsanalyse der SCD-Isoformen SCD1 und SCD4 im linken Ventrikel nach 14 Wochen Versuchsdauer ; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Weder bei SCD1 noch bei SCD4 hat die Fütterung der fettreichen Diät einen signifikanten Einfluss auf die Expression dieser Enzyme (vgl. Abb. 4-19). SCD4 scheint sowohl bei jungen wie alten Tieren unter HF-Diät im LV reduziert. Auffällig ist der Unterschied in der Expression von SCD1 zwischen jungen Tieren und alten Tieren unter HF-Diät. Im LV alter Tiere ist hier die Expression unter HF-Diät signifikant erhöht im Vergleich zu jungen Tieren der gleichen Gruppe.

4.4.2 Adiponektin-vermittelte AMPK-Aktivierung

Adiponektin ist eines der wichtigsten Fettgewebshormone bei der metabolischen Regulation. Komponenten des Adiponektin-AMPK-Signalweges werden daher im Folgenden genauer untersucht.

Adiponektin zirkuliert in Form von Trimeren, Hexameren oder hochmolekularen Multimeren im Plasma (Waki et al. 2003) und bindet als Hexamer bzw. hochmolekulares Multimer unter Vermittlung des Korezeptors tCadherin an Adiponektin-Rezeptoren (AdipoR1 und AdipoR2) (Denzel et al. 2010).

4.4.2.1 Untersuchung des Serums

Zunächst untersuchten wir in den Tieren neben der Serumkonzentration von Adiponektin auch Leptin und Insulin sowie den Gehalt an Glucose, um die allgemeine Stoffwechsellaage der Tiere sowie deren Insulinsensitivität zu charakterisieren.

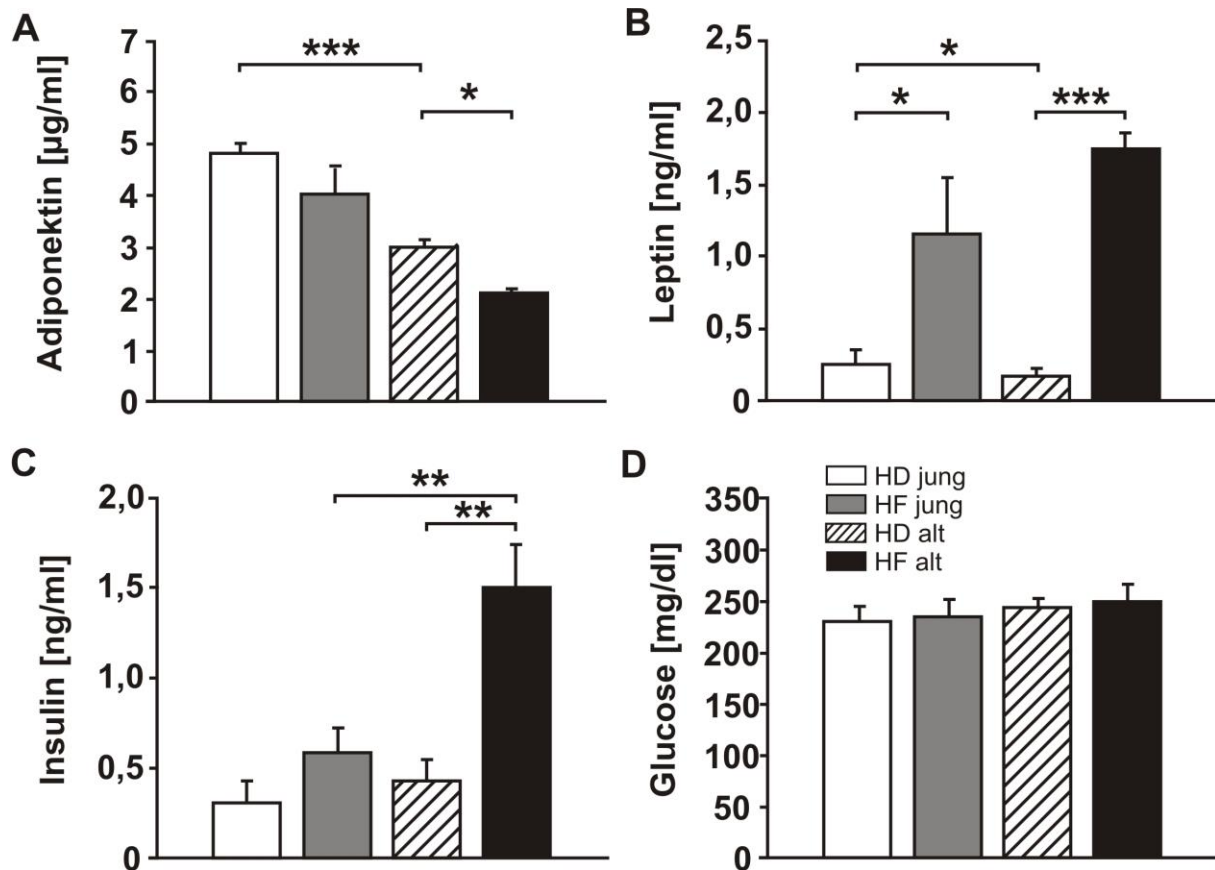


Abbildung 4-20 Untersuchung der Serum-Konzentrationen von Adiponektin (A), Leptin (B) und Insulin (C) und Glucose (D) nach 14 Wochen Versuchsdauer; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Abbildung 4-20 A zeigt den Adiponektin-Gehalt im Serum. Alte Tiere weisen einen signifikant niedrigeren Gehalt als junge Tiere im Serum auf. Dieser Effekt wird in der HF-Gruppe der alten Tiere noch verstärkt. Dagegen ist in beiden Altersgruppen der fettreich gefütterten Tiere ein Anstieg der Leptin-Konzentration zu sehen (Abb. 4-20 B). Auch die Leptin-Expressionsanalysen, nicht jedoch die Adiponektin-Expressionsanalysen, des visceralen Fettgewebes (Abb. 4-21) spiegeln diese Daten wieder. Die Analysen der Konzentration an Insulin ergeben für die jungen Tiere eine moderate Steigerung und für die alten Tiere der HF-Gruppe stark gesteigerte Werte gegenüber den Kontrollen (Abb. 4-20 C). Die Glucose-Serumwerte zeigen kaum Unterschiede zwischen den HF- und Kontrollgruppen der jungen Tiere nach 14 Wochen Versuchsdauer.

4.4.2.2 Expressionsanalysen von Adiponektin im Fettgewebe

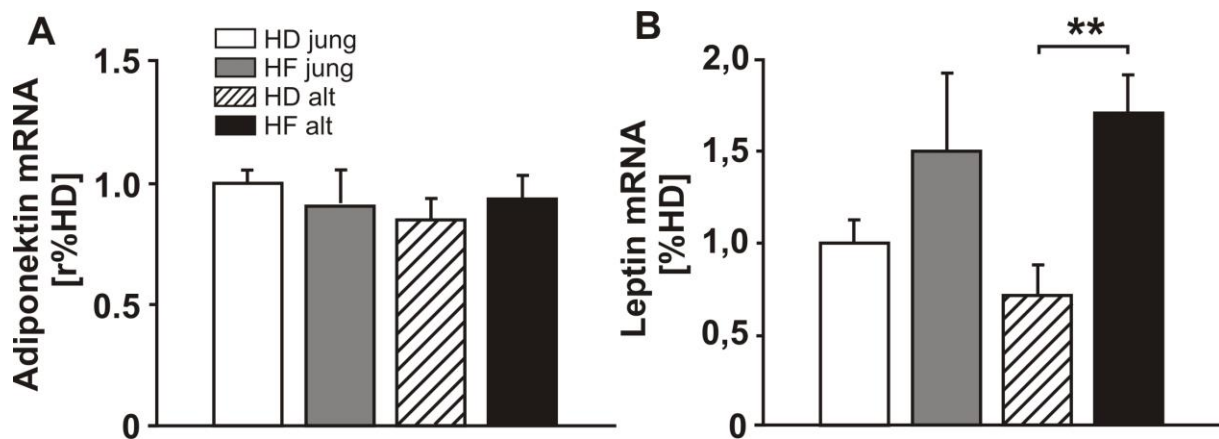


Abbildung 4-21 Expressionsanalysen der Fettgewebshormone Adiponektin und Leptin im visceralen Fettgewebe nach 14 Wochen; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Die Analyse der mRNA-Level für Adiponektin im visceralen Fettgewebe ergibt, dass die Expression in der HF-Gruppe nach 14 Wochen Versuchsdauer keinen Unterschied zu den Kontrolltieren der HD-Gruppe aufweist. Dagegen ist die Expression von Leptin im Fettgewebe der alten Tiere erhöht.

4.4.2.3 Adiponektin-Rezeptoren

AdipoR1 ist ubiquitär nachweisbar und wird vorrangig im Skelettmuskel exprimiert. Dagegen findet man AdipoR2 hauptsächlich in der Leber.

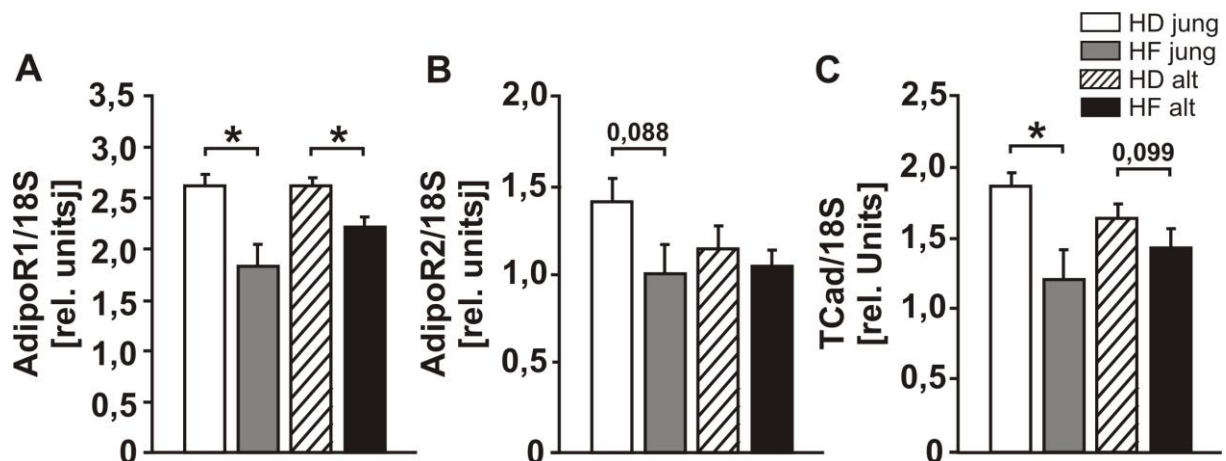


Abbildung 4-22 Expression der Adiponektin-Rezeptoren AdipoR1 (A), AdipoR2 (B) und tCadherin (C) im linken Ventrikel nach 14 Wochen; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Die Expressionsanalyse im LV zeigt mit zunehmender Versuchsdauer eine deutliche Herunterregulation der Rezeptorexpression in der HF-Gruppe. Besonders deutlich ist die Expressionsreduktion für AdipoR1 ausgeprägt (Abb. 4-22 A). AdipoR2 zeigt lediglich in der Gruppe der jungen HF-Tiere eine tendenzielle Reduktion. Dagegen ist tCad in dieser Gruppe signifikant reduziert und in der alten Tiergruppe die Tendenz dazu zu beobachten. Insgesamt betrachtet, spricht eine verminderte Expression der Rezeptoren für ein reduziertes Adiponektin-Signal im LV.

4.4.2.4 Expression der Adiponektinparaloge C1q/TNFA-related proteins (CTRP)

Wong et al. identifizierten 2004 (Wong et al. 2004) über die hoch konservierte globuläre C1q-Domäne eine Gruppe von Adiponektin-Paralogen (C1q/TNF α -related proteins (CTRPs) 1–7), die im Gegensatz zum Adiponektin nicht nur im Fettgewebe, sondern ubiquitär exprimiert werden. Expressionsanalysen wiesen die CTRPs in nahezu allen Geweben der Maus nach (Abb. 4-23). Für einige der CTRPs wurden, wie bereits vermutet, auch Adiponektin-ähnliche Effekte nachgewiesen (Seldin et al. 2013). CTRP2 und CTRP7 zeigen strukturell die größte Übereinstimmung (42-43%) mit Adiponektin (Wong et al. 2004).

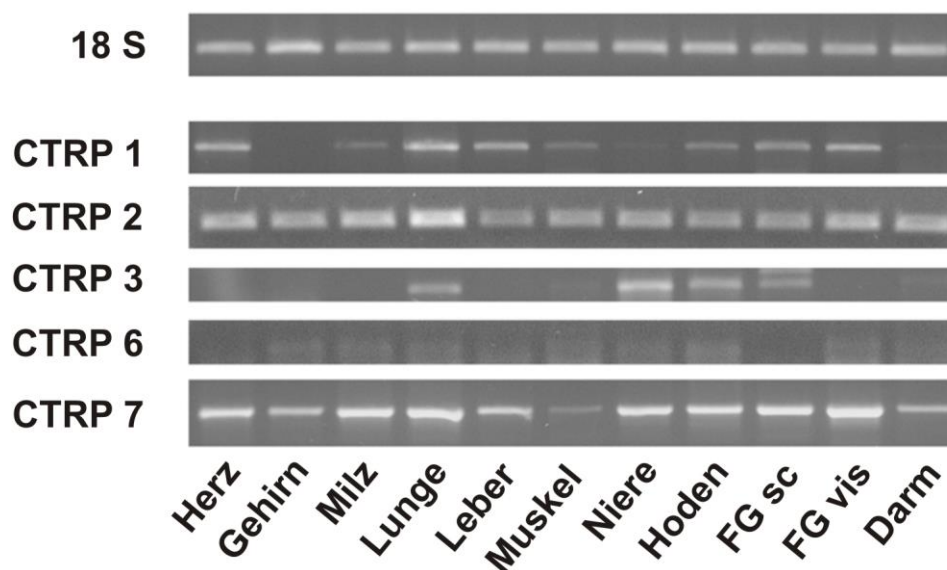


Abbildung 4-23 Expressionsanalyse der Adiponektin-Paralogen in verschiedenen Mausorganen (FG sc - Fettgewebe subcutan; FG vis - Fettgewebe visceral)

So wird im Myokard neben CTRP1 und CTRP2 hauptsächlich CTRP7 exprimiert. CTRP2 ist in der Lage durch Aktivierung des AMPK-Signalweges regulierend auf die Fettsäureoxidation und die Glycogenakkumulation einzuwirken (Wong et al. 2004). Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, ist ein Einfluss der fettreichen Nahrung auf die Expression und die daraus resultierenden Serumspiegel von Adiponektin kaum

nachweisbar. Aufgrund der strukturell hohen Homologie und des Vorkommens im Herz untersuchten wir die Expression der Adiponektin-Paralogen CTRP2 und CTRP7 vor dem Hintergrund einer möglichen kompensatorischen Expressionsveränderung bei fehlendem Einfluss von Adiponektin.

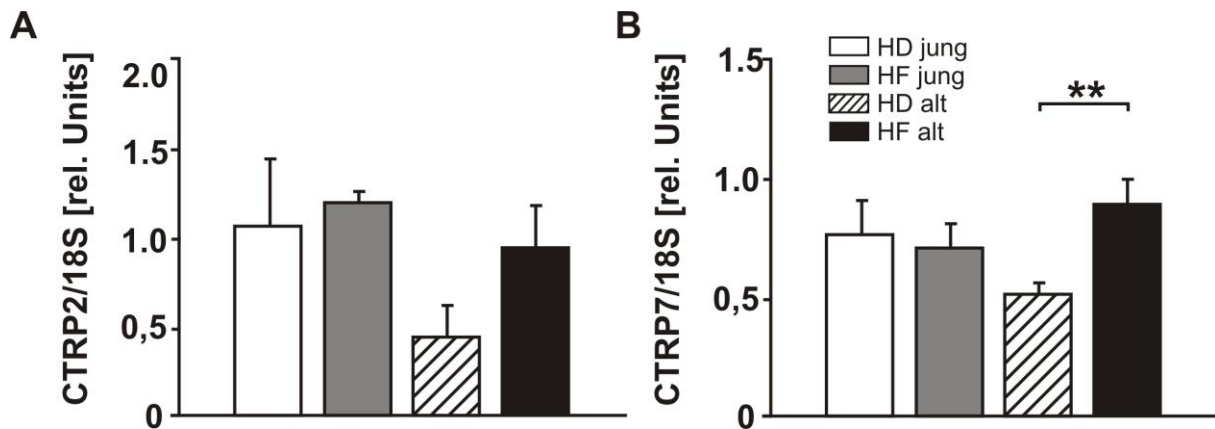


Abbildung 4-24 Expressionsanalyse der Adiponektin-Paralogen CTRP2 (A) und CTRP7 (B) im linken Ventrikel nach 14 Wochen; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Die Expression der beiden herzspezifischen CTRPs bleibt unter dem 14-wöchigen Einfluss der fettreichen Diät weitgehend unbeeinflusst im LV junger Tiere (Abb. 4-24). Auffällig ist die scheinbar verringerte Expression von CTRP2 und CTRP7 mit zunehmendem Alter der Tiere. Interessanterweise finden wir unter dem Einfluss der fettreichen Nahrung in den alten Tieren eine gesteigerte Expression beider Gene im LV. Dies könnte auf eine kompensatorische Funktion dieser Proteine hindeuten, die die verringerte Adiponektin-Expression, die wir im Fettgewebe der alten Tiere der HF-Gruppe nachweisen konnten, möglicherweise ausgleicht. Nach 14 Wochen Versuchsdauer ist keine Expressionsänderung in der Leber der Tiere der HF-Gruppe nachweisbar. Eine deutliche Expressionsreduktion von CTRP7 ist auch in der Leber der HD-Gruppe bei den alten Tieren (HDj $0,46 \pm 0,06$; HDa $0,3 \pm 0,06$) zu beobachten (nicht gezeigt). Dagegen weisen beide Gene bereits nach 6 Wochen eine signifikant reduzierte Expression im Skelettmuskel der jungen und alten Tiere der HF-Gruppe auf, welche auch nach 14 Wochen fortbesteht (nicht gezeigt).

4.4.2.5 Expressionsanalysen von AMP-aktivierter Protein-Kinase (AMPK)

Die AMP-aktivierte Protein-Kinase (AMPK) stellt einen heterotrimeren Enzymkomplex, bestehend aus einer alpha ($\alpha 1$ oder $\alpha 2$)-, beta ($\beta 1$ oder $\beta 2$)- und gamma ($\gamma 1$, $\gamma 2$ oder $\gamma 3$)-Untereinheit, dar. Der im Myokard nachweisbare AMPK-Komplex besteht vorrangig aus den Untereinheiten $\alpha 2\beta 2\gamma 2$. Eine Aktivierung des Enzymkomplexes erfolgt über

Phosphorylierung der Aminosäure Threonin an Position 172 der α -Untereinheit. Um eine Aussage über einen möglichen Einfluss der fettreichen Diät auf die AMPK-Expression und deren molekulare Zusammensetzung im LV treffen zu können, wurden alle Untereinheiten auf ihre Expression untersucht.

Die für das Myokard typischen AMPK-Untereinheiten, α 2, β 2 und γ 2, sind in ihrer Expression nahezu unbeeinflusst (Abb. 4-25). α 2AMPK ist mit zunehmendem Alter der Tiere signifikant reduziert in der Expression. Tendenziell kann für β 1 und γ 1 AMPK eine Verringerung der Expression mit zunehmendem Alter der Tiere und in jungen Tieren unter dem Einfluss fettreicher Diät beobachtet werden (nicht gezeigt).

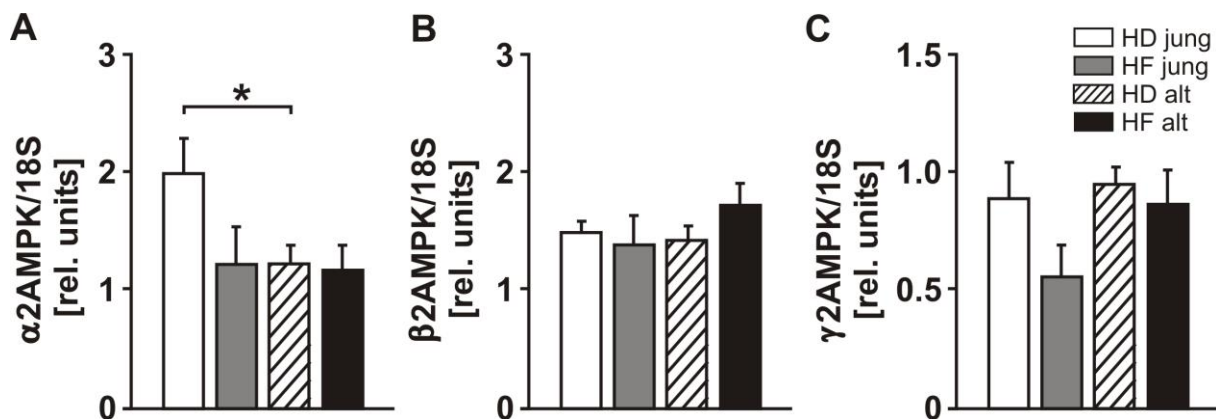


Abbildung 4-25 Expressionsanalysen der AMPK-Untereinheiten (A- α 2AMPK; B- β 2AMPK; C- γ 2AMPK) im linken Ventrikel; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere) nach 14 Wochen Versuchsdauer

4.4.2.6 Charakterisierung des Aktivierungszustandes der AMPK

Mit Aktivierung der Kinase werden weitere downstream-targets wie z. B. ACC2 beeinflusst (Park et al. 2002). ACC2 wird durch Phosphorylierung an Serin 79 von AMPK inaktiviert (Long and Zierath 2006). Die Folge ist eine reduzierte Konzentration an Malonyl-CoA, welche zu einem verstärkten Transport von langkettigen Fettsäuren in die mitochondriale Matrix und somit einer verstärkten Fettsäure-Oxidation führt (Long and Zierath 2006).

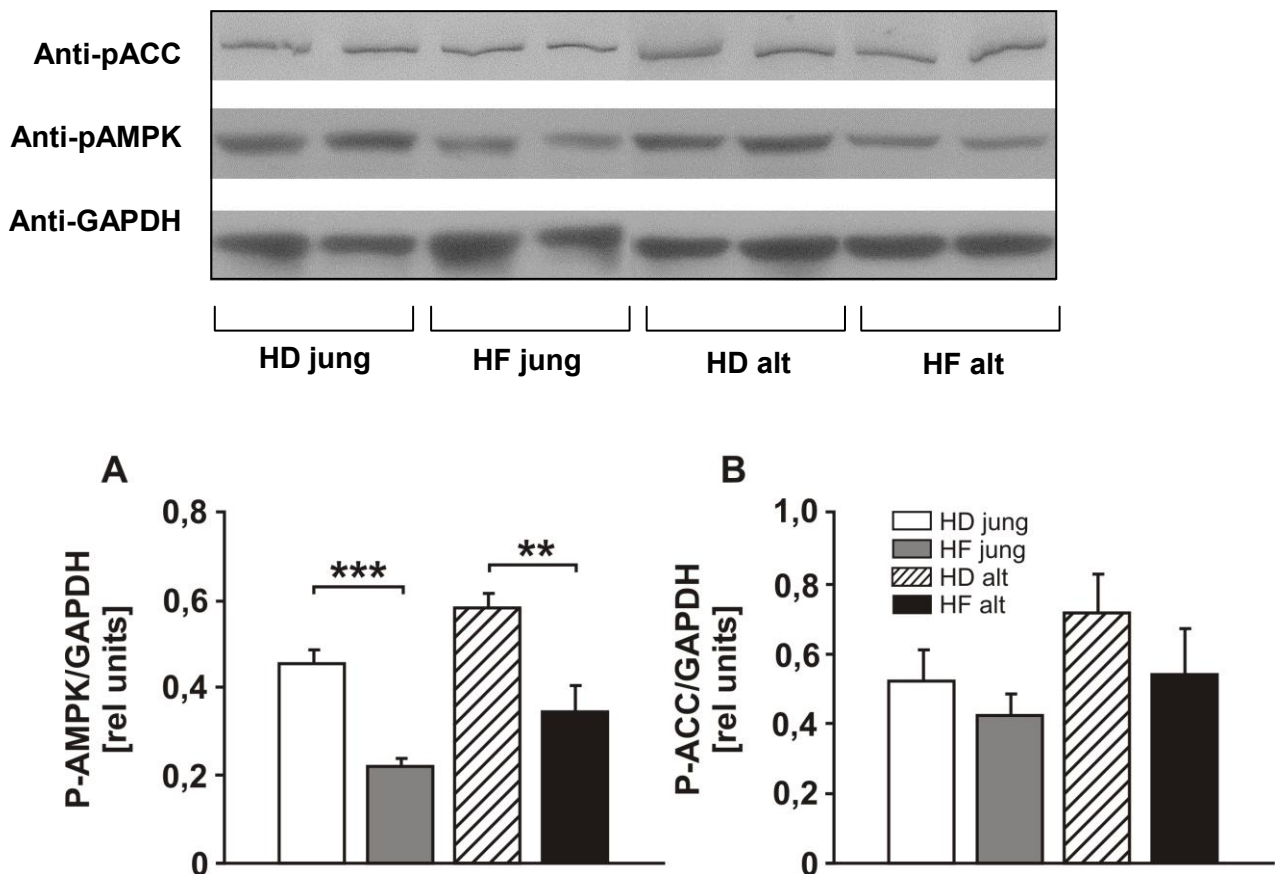


Abbildung 4-26 Aktivität der AMPK u ACC in der Leber – Antikörperfärbung gegen die Phosphorylierungsstellen Thr 172 von AMPK und Serin 79 von ACC; repräsentative Westernblots ; (n = 2 alte und n = 2 junge Tiere)

Die Charakterisierung der Aktivität von AMPK und ACC mittels Western-Blot-Analysen zeigt deutlich eine verminderte Phosphorylierung der AMPK nach Aufnahme einer fettreichen Diät über 14 Wochen. Die verminderte AMPK-Phosphorylierung bewirkt eine reduzierte Aktivität dieses Komplexes, was eine leicht verminderte Phosphorylierung der ACC zur Folge hat (Abb. 4-26). Eine reduzierte Phosphorylierung der ACC würde in diesem Falle zu einer erhöhten Aktivität und einer verstärkten Synthese von Malonyl-CoA führen.

Über weitere mögliche downstream-targets, wie PGC1 α , ist ebenfalls ein Einfluss auf verschiedene metabolische Wege denkbar (vgl. 4.4.3.) (Lopez-Lluch et al. 2008).

4.4.3 Mitochondriale Funktion und Biogenese

AMPK fungiert nicht nur als zentraler Stoffwechselregulator, sondern kann auch in Abläufe der mitochondrialen Biogenese eingreifen (Lopez-Lluch et al. 2008). So führt die direkte Phosphorylierung von PGC1 α durch AMPK neben metabolischen

Veränderungen, wie einer Steigerung der Glucose-Aufnahme, auch zu einer Steigerung der mitochondrialen Biogenese und Genexpression (Lopez-Lluch et al. 2008). PGC1 α wirkt im aktivierten Zustand regulierend auf NRF1, PPAR α und Tfam und stellt damit einen zentralen Regulator mitochondrialer Biogeneseaktivität dar (Duncan et al. 2007). So induziert die PGC1 α -vermittelte Aktivierung von NRF1 die Expression von Tfam, einem Transkriptionsregulator der mitochondrialen DNA (Wu et al. 1999) und führt zur Stimulation der mitochondrialen Biogenese und Atmung.

Basierend darauf, untersuchten wir ausgewählte Gene der mitochondrialen Biogenese auf ihre Expression (Nuclear Respiratory Factor - NRF1; mitochondrialer Transkriptionsfaktor – Tfam, PPARgamma Coactivator 1alpha – PGC1 α) (Abb. 4-27).

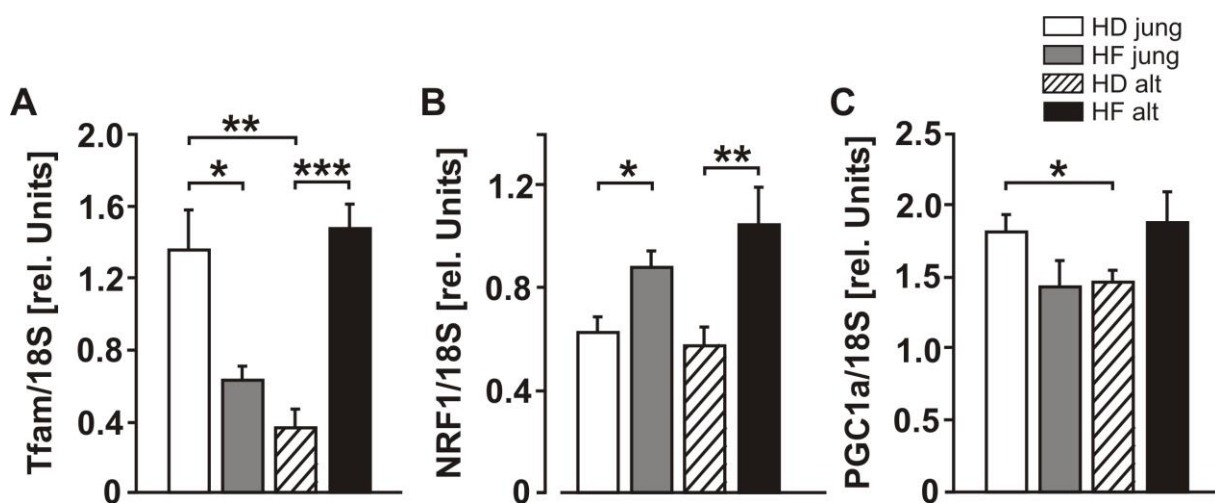


Abbildung 4-27 Expressionsanalyse von Genen der mitochondrialen Biogenese - Tfam (A), NRF1 (B) und PGC1 α (C) im LV nach 14 Wochen Versuchsdauer; (n = 8 alte und n = 6 junge Tiere)

Wie aus Abb 4-27 ersichtlich ist, können wir mit zunehmendem Alter eine deutliche Reduktion an Tfam-mRNA nachweisen, was die Ursache für die verringerte Expression von ND5, ND6 und COX3 sein könnte (Abb. 4-28). NRF1 zeigt mit zunehmendem Alter keine Änderung der Expressionslevel. Überraschenderweise finden wir einen Anstieg der Expression von NRF1 und Tfam im Herzen der alten Tiere unter dem Einfluss fettreicher Diät, ebenso wie NRF1 im Herzen junger Tiere nach 14 Wochen Versuchsdauer. PGC1 α , als zentraler Regulator der mitochondrialen Biogenese, ist mit zunehmendem Alter signifikant verringert.

4.4.3.1 Expressionsanalysen Atmungskettenkomplexe

Teile der Atmungskettenkomplexe werden mitochondrial codiert und unterliegen Transkriptionsregulatoren wie z. B. Tfam (Duncan et al. 2007). Da Tfam mit

zunehmendem Alter in seiner Expression stark herunterreguliert ist (Abb. 4-27A), vermuteten wir eine Expressionsminderung der mitochondrial codierten Gene der Atmungskettenkomplexe. Die Expressionsanalysen der Atmungskettenkomplex-Untereinheiten sind in Abb. 4-28 dargestellt. Untersucht wurden die mitochondrial kodierten Gene der Komplexe I (ND1, ND5, ND6) und IV (COX I, COX III).

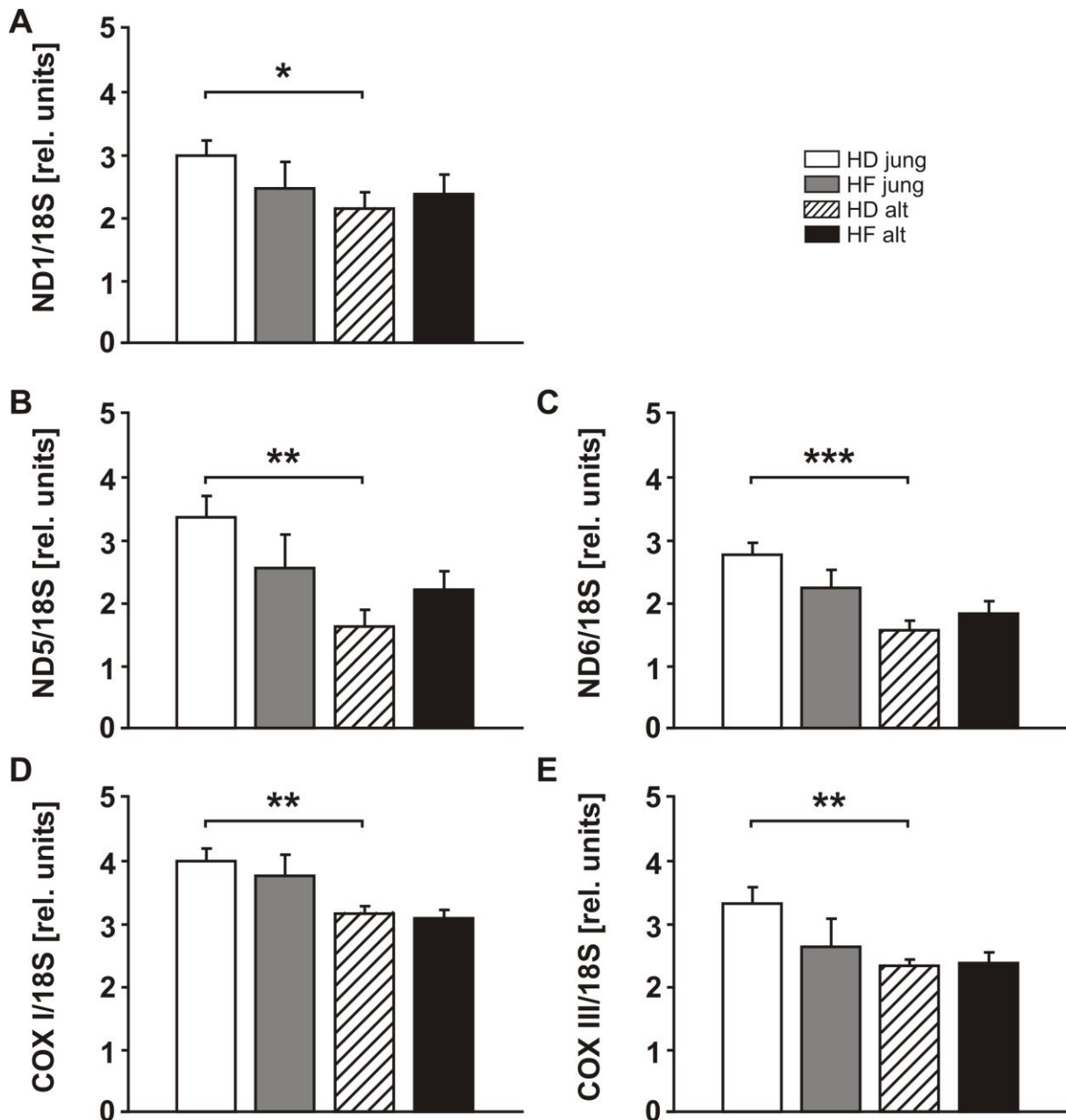


Abbildung 4-28 Expressionsanalysen im LV ausgewählter Proteine der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe Komplex I -ND1 (A), -ND5 (B), -ND6 (C), Komplex IV –COX I (D) und –COX III (E); (n = 8 alte und n = 8 junge Tiere); 14 Wochen Versuchsdauer

Einhergehend mit der Reduktion an Tfam können wir tatsächlich eine verringerte Expression der Atmungskettenkomplex-Untereinheiten ND1, ND5, ND6 und COX I und

COX III mit zunehmendem Alter beobachten. Unter dem Einfluss von HFD finden wir bei fast allen Genen eine tendenzielle, nicht signifikante Verringerung der Expression in jungen Tieren.

Diese bereits nach 6 Wochen fettreicher Diät verzeichnete Expressionsminderung kann auch über einen längeren Zeitraum bestätigt werden. Nach 24 Wochen ist die Expression von beispielsweise ND1 in jungen Tieren der HF-Gruppe um ca. 40 % gegenüber den Kontrolltieren der HD-Gruppe vermindert (ohne Abb.).

So resultiert die Expressionsminderung mitochondrialer Gene (Abb. 4-28) insbesondere bei den Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe vermutlich in einer Verminderung der Anzahl an Atmungskettenkomplexen. Dies kann letztendlich auch zu einer Reduktion der Aktivität der Atmungskettenkomplexe führen.

4.5 Fettsäurebehandlung von HEK293 Zellen

In den weiteren Versuchen, welche an einem *in vitro* Modell durchgeführt wurden, sollten zelluläre Effekte einzelner ausgewählter Fettsäuren untersucht werden.

In Vorversuchen zeigte sich, dass HEK293-Zellen eine höhere Transfektionsrate aufwiesen, als H9C2-Kardiomyoblasten und das transfizierte Plasmid für die $\alpha 2$ AMPK ($\alpha 2$ AMPK)-Überexpression zudem stärker exprimierten (ohne Abb.). Aus diesem Grund wurden die anschließenden Versuche in der HEK293-Zelllinie durchgeführt.

Die Fettsäurebehandlung wurde an HEK293-Zellen (4.5.1) und $\alpha 2$ AMPK(human)-überexprimierenden HEK293-Zellen (4.5.2) durchgeführt. Im Vordergrund der Experimente stand die Wirkung gesättigter (Palmitat; 16:0) und ungesättigter Fettsäuren (Oleat; 18:1; DHA; 22:6), einzeln und in Kombination, auf den zellulären Stoffwechsel sowie vor dem Hintergrund einer $\alpha 2$ AMPK-Überexpression. Die Auswahl der Fettsäuren erfolgte auf Grund deren hoher Konzentration in der im Tierversuch verwendeten HFD.

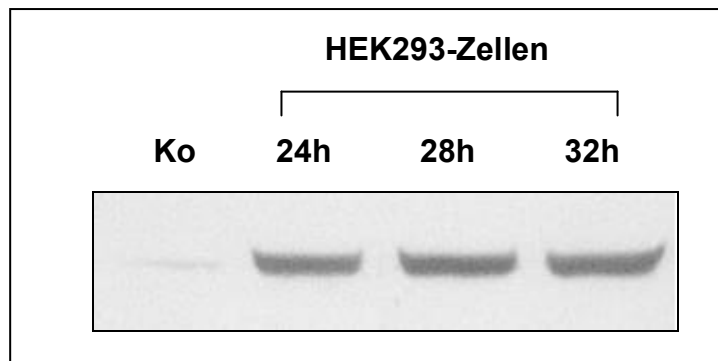


Abbildung 4-29 Bestimmung der Expressionsmaxima von $\alpha 2$ AMPK in transfizierten HEK293-Zellen; repräsentativer Westernblot gefärbt mit $\alpha 2$ AMPK-Antikörper. Als Kontrolle untransfizierte HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen zeigen nach 24 h eine starke Expression der $\alpha 2$ AMPK-Untereinheit (Abb. 4-29). Den Zellen wurde 8 h nach Transfektion die Albumin-gebundenen Fettsäuren ins Medium zugegeben, um ein mindestens 12-stündiges Einwirkung der Fettsäuren zu gewährleisten.

4.5.1 Fettsäure-Behandlung untransfizierter HEK293-Zellen

4.5.1.1 Behandlung untransfizierter Zellen mit Palmitat

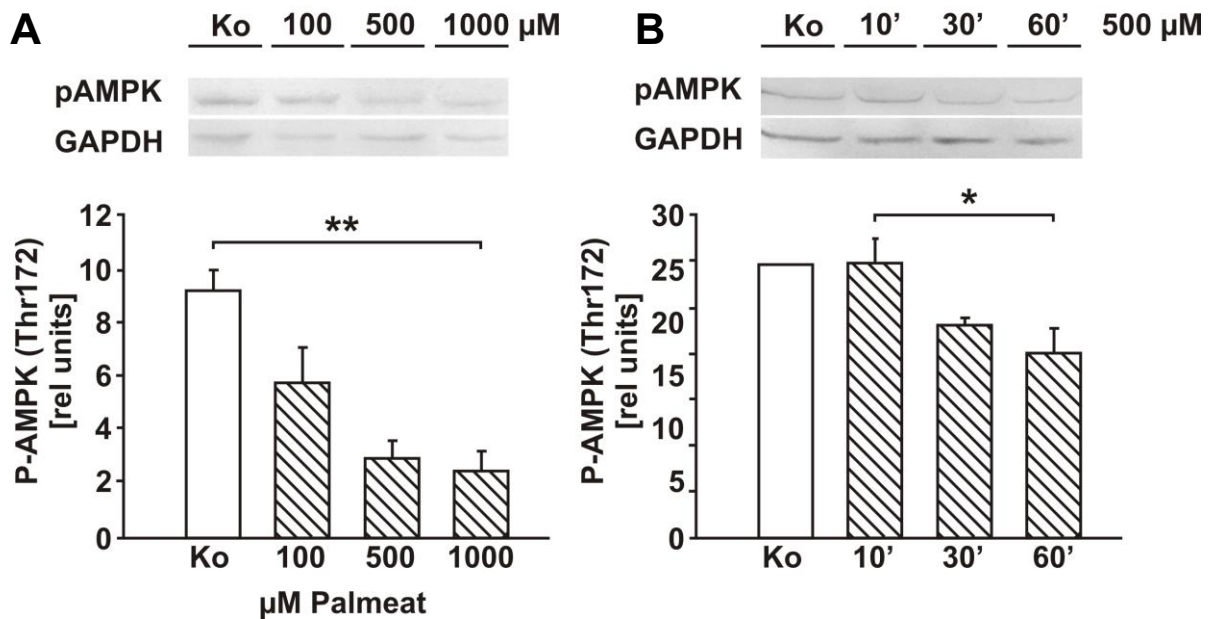


Abbildung 4-30 Wirkung verschiedener Palmitatkonzentrationen auf die Phosphorylierung der aAMPK-UE untransfizierter Zellen nach 20 h Inkubation (A) und Wirkung von 500 µM Palmitat auf Phosphorylierung der aAMPK-UE nach 10', 30' und 60' Inkubation (B)

Wie in Abb. 4-30 A dargestellt, sieht man eine beginnende Reduktion der Phosphorylierung ab einer Konzentration von 100 µM Palmitat im Medium nach 20 h Inkubation. Eine Konzentration von 500 µM Palmitat zeigt eine mehr als 50%-ige Reduktion der Phosphorylierung. Diese Konzentration der Fettsäure wurde in den nachfolgenden Versuchen so beibehalten. Da Dephosphorylierungen sehr schnell erfolgen können, wurde nach 10, 30 und 60 min der Phosphorylierungszustand der AMPK von Palmitat (500 µM)-behandelten Zellen untersucht (Abb. 4-30 B). Wie in Abb. 4-30 ersichtlich, kann ein Rückgang der Phosphorylierung innerhalb der ersten 60 min nach Einwirkung des Palmitats verzeichnet werden. Nach 20 h Palmitatbehandlung (500 µM) der Zellen ist die Phosphorylierung noch immer stark vermindert (Abb. 4-30 A).

4.5.1.2 Behandlung untransfizierter Zellen mit Oleat

Da aus den vorangegangenen Versuchen bekannt war, dass nach 60-minütiger Fettsäureeinwirkung eine Reduktion der Phosphorylierung der aAMPK-Untereinheit zu verzeichnen ist, wurden die Oleat-behandelten untransfizierten Zellen ebenfalls nach einer 1 h geerntet. Deutlich ist auch hier die steigende Dephosphorylierung der

aAMPK-Untereinheit mit steigender Konzentration der Fettsäure (Abb. 4-31) zu sehen. Der in Abb. 4-31 A dargestellte repräsentative Westernblot zeigt, dass die verstärkte Abnahme der Phosphorylierung nicht auf einen Abbau der AMPK-Untereinheit, sondern auf eine gezielte Dephosphorylierung zurückzuführen ist.

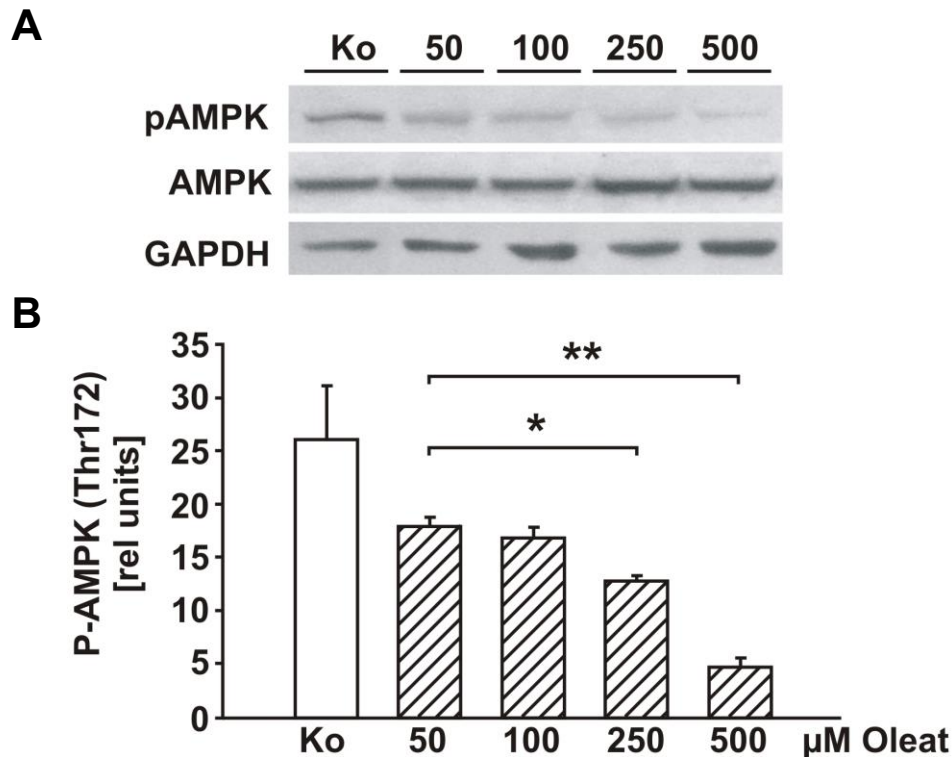


Abbildung 4-31 Wirkung von steigenden Ölsäurekonzentrationen auf den Aktivitätszustand der AMPK Die in Abb. (A) dargestellten repräsentativen Westernblots zeigen bei gleichbleibender Konzentration von aAMPK und GAPDH eine zunehmende Dephosphorylierung mit steigender Ölsäurekonzentration (B) nach 60 min Einwirkdauer.

4.5.1.3 Behandlung untransfizierter Zellen mit DHA

Untransfizierte Zellen wurden mit der mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA; 22:6) entsprechend den vorangegangenen Versuchen behandelt. Deutlich ist die zunehmende Phosphorylierung und somit Aktivierung der AMPK mit zunehmendem Anstieg der Konzentration an albuminungebundener Fettsäure im Medium zu beobachten. Wie in Abbildung 4-32 ersichtlich, wird bereits bei einer Konzentration von 100 μM DHA die maximale Aktivierung von AMPK erreicht. Eine Konzentrationsverdopplung bewirkt keine weitere Steigerung der Aktivität.

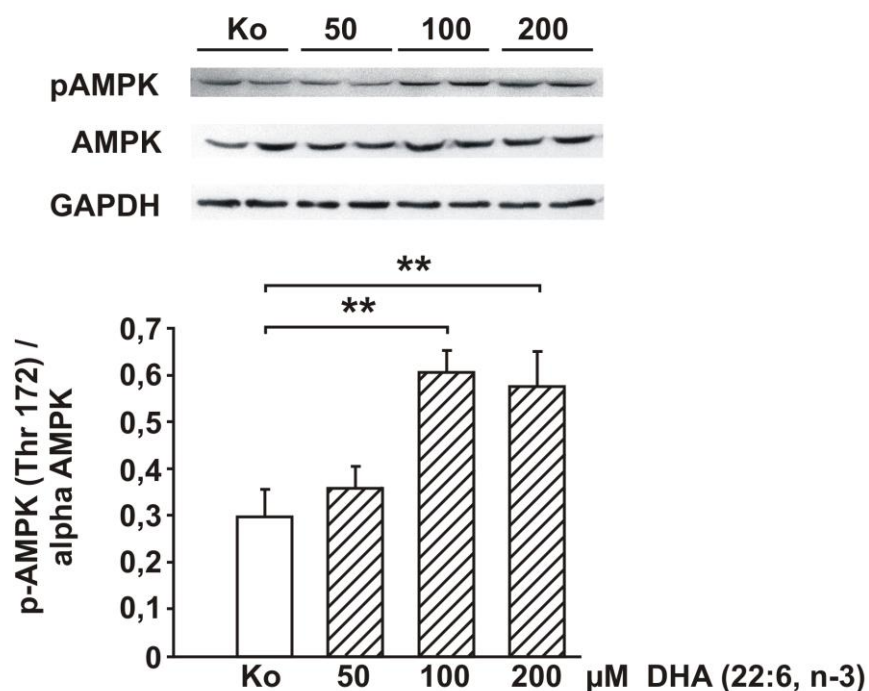


Abbildung 4-32 repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Docosahexaensäure (DHA) verschiedener Konzentration auf die Aktivität von AMPK in untransfizierten HEK 293-Zellen

4.5.2 Fettsäure-Behandlung transfizierter (a2AMPK-überexprimierender)-HEK293-Zellen

Aufgrund der beobachteten Wirkung von Fettsäuren auf die Phosphorylierung des exprimierten a2AMPK in HEK-Zellen (4.5.1.) zeigt sich der deutliche Einfluss der Nahrung, insbesondere der Fettsäuren, auf die Phosphorylierung der AMPK und damit auch auf die Regulation des Stoffwechsels. Hierbei stellt sich die Frage, ob eine Überexpression von a2AMPK zu einer Abminderung oder gar Aufhebung der Effekte der Fettsäuren führen kann.

Um dies zu testen, wurden humane a2AMPK transfizierte Zellen mit verschiedenen Fettsäuren unterschiedlicher Konzentration und Kombination behandelt. Vor dem Hintergrund der Überexpression der herzspezifischen a2AMPK-Untereinheit wurden die Phosphorylierungszustände der a2AMPK untersucht.

4.5.2.1 Behandlung transfizierter Zellen mit Palmitat

Die Zellen wurden transfiziert und nach 8 h dem Medium die Fettsäure in den Konzentrationen von 50, 100 und 500 μM zugesetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 h erfolgte die Ernet der Zellen und Extraktion von RNA sowie Protein.

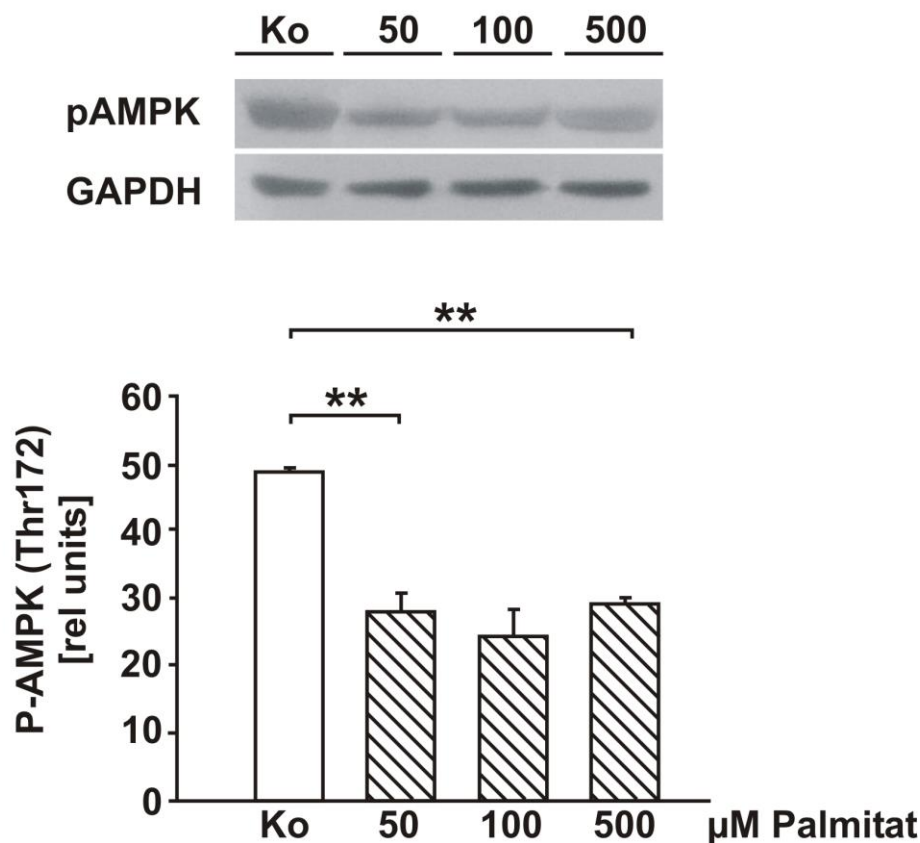


Abbildung 4-33 repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Palmitat verschiedener Konzentration auf die Aktivierung von AMPK in a2AMPK-Überexprimierenden transfizierten Zellen

Die mit a2AMPK transfizierten Zellen zeigen nicht nur eine deutliche Überexpression von a2AMPK, sondern weisen auch mehr phosphorylierte und somit aktive AMPK in der Zelle auf (vgl. Abb. 4-29 Ko untransfiziert zu transfiziert). Wie in Abb. 4-33 ersichtlich, finden wir auch hier eine nachweisbare Reduktion der Phosphorylierung der aAMPK-Untereinheit unter Palmitatbehandlung gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dieser Aktivierungszustand ändert sich bei Erhöhung der Fettsäure-Konzentration nicht, d. h. mit zunehmender Konzentration ist keine weitere Dephosphorylierung zu beobachten.

4.5.2.2 Behandlung transfizierter Zellen mit Oleat

In diesem Versuch wurden a2AMPK-überexprimierende HEK293-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Oleat behandelt. Wie aus Abb. 4-34 ersichtlich, finden wir hier ein anderes Bild der AMPK-Aktivierung im Vergleich zur Behandlung untransfizierter Zellen mit dieser Fettsäure.

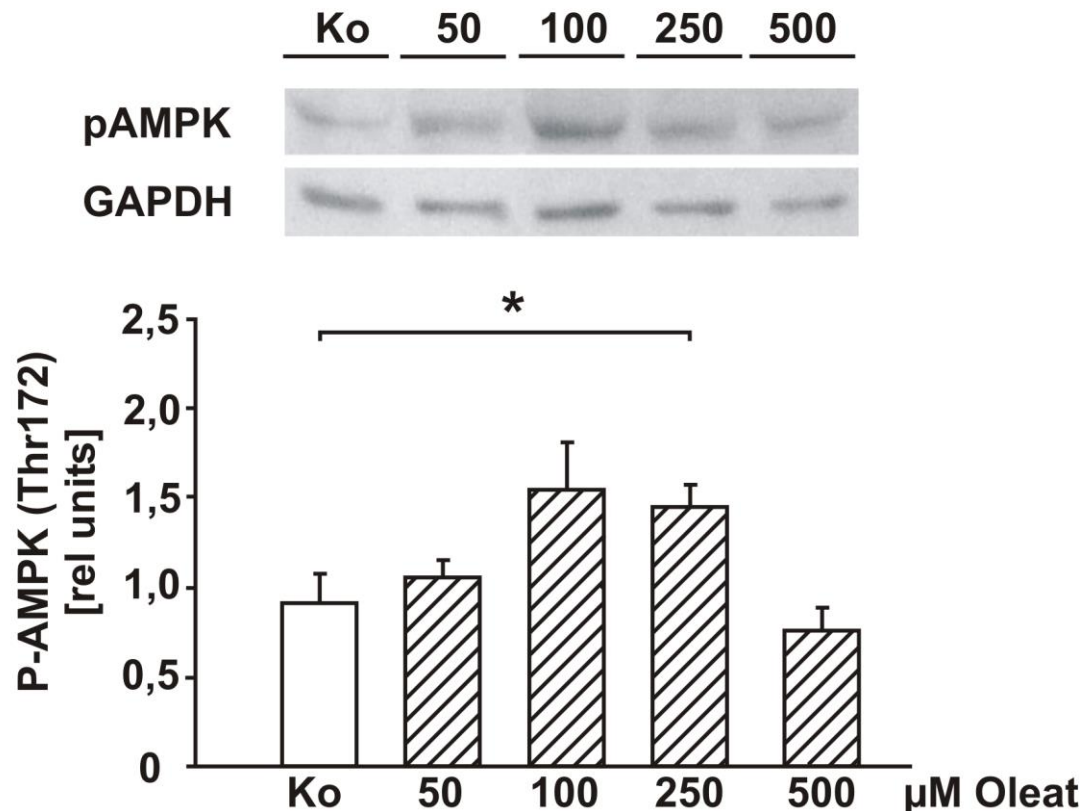


Abbildung 4-34 repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Oleat verschiedener Konzentration auf die Aktivität von AMPK in a2AMPK-Überexprimierenden transfizierten Zellen

Untransfizierte Zellen zeigen bereits ab 100 μM im Medium eine verminderte Phosphorylierung der alpha-UE der AMPK (vgl. 4.5.1.1 Abb. 4-30). Dagegen zeigt sich bei a2AMPK-Überexpression eine leicht erhöhte Phosphorylierung unter Oleat-Konzentrationen von 50 μM und 100 μM. Ab 250 μM nimmt die Phosphorylierung mit zunehmender Konzentration der Fettsäure wieder ab und erreicht mit 500 μM das Niveau der unbehandelten Kontrolle.

4.5.2.3 Behandlung transfizierter Zellen mit einer Kombination von Oleat und Palmitat

Für diesen Versuch wurde zur Behandlung der Zellen ein Gemisch aus den Fettsäuren Oleat und Palmitat verwendet. Das verwendete Mischungsverhältnis entspricht dem im fettreichen Futter der Tiere vorkommendem Verhältnis der Fettsäuren zueinander. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden die Fettsäuren 8 h nach Transfektion dem Medium zugegeben und nach weiteren 20 h wurden die Zellen geerntet.

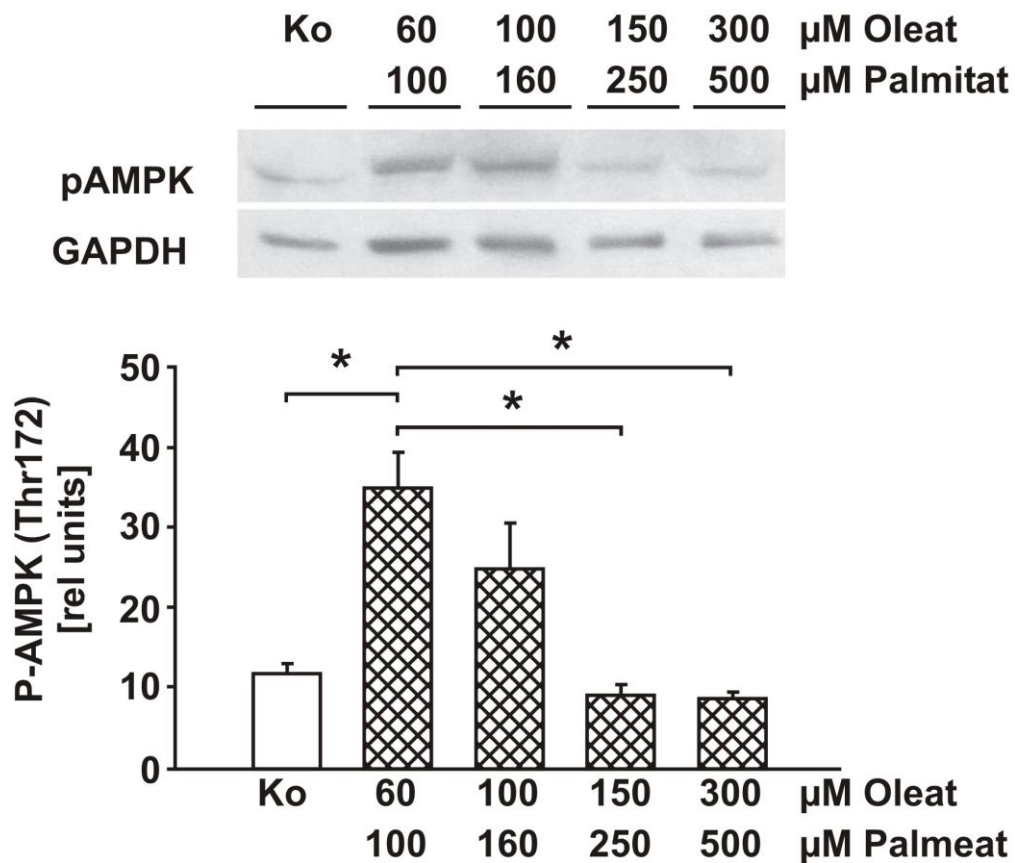


Abbildung 4-35 repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Oleat und Palmitat in Kombination bei verschiedener Konzentration auf die Aktivität von AMPK in $\alpha 2$ AMPK-Überexprimierenden transfizierten Zellen

Deutlich ist die starke Aktivierung der AMPK unter den niedrigen Konzentrationen an Palmitat und Oleat von 60 μ M/100 μ M und 100 μ M/160 μ M (Abb. 4-35) zu sehen. Ab einer Konzentration von 150 μ M Oleat/250 μ M Palmitat sinkt die Menge an phosphorylierter AMPK auf das Niveau der Kontrolle.

5 Diskussion

Eine intrazelluläre Akkumulation von Fettsäuren, Triglyceriden und deren Stoffwechselderivaten in Geweben wie Myokard, Muskel, Pankreas oder Leber ist der Ausgangspunkt für eine chronische Dysfunktion des entsprechenden Organs und resultiert in Insulin-Resistenz, Kardiomyopathie, Steatohepatosis oder β -Zell-Dysfunktion (Unger and Orci 2001; Schaffer 2003; Dewald et al. 2005). In-vitro-Studien zeigten, dass langkettige gesättigte Fettsäuren wie Palmitat in lipotoxische Stoffwechselwege involviert sind und zur Kardiomyopathie führen (Sparagna et al. 2000), wohingegen ungesättigte Fettsäuren protektiv, beispielsweise durch Stimulation der Triglyceridsynthese, wirken, (Hardy et al. 2003; Listenberger et al. 2003).

Auch Alterungsprozesse sind eng mit der Ausbildung mitochondrialer Dysfunktionen, verursacht durch verminderte Elektronentransferraten oder bedingt durch erhöhten Protonenausstrom aus der mitochondrialen Matrix (Protonenleak), verknüpft (Navarro and Boveris 2007). So finden wir im alternden Gewebe Veränderungen des zellulären Metabolismus, verbunden mit einer Akkumulation von zellschädigenden Stoffwechselprodukten, wie ROS oder Ceramiden. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die toxischen Auswirkungen einer Lipidlast vor allem auf freie Fettsäuren (non-esterified fatty acids - NEFA) und deren Produkte (Ceramide und Diacylglycerole) zurückzuführen sind und möglicherweise dieselben Pathomechanismen zu Adipositas, Herzinsuffizienz und Alterung beitragen (Listenberger et al. 2003; Schaffer 2003). Die hohe Dichte und damit die erhöhte Zahl dysfunktioneller Mitochondrien in den Kardiomyozyten ist nach Theorie der mitochondrialen Alterung eine Ursache für ansteigende oxidative Schädigungen betreffend Phospholipide, Proteine oder DNA der Zellen (Judge and Leeuwenburgh 2007). Fette und Fettsäuren, als Ausgangspunkt dieser metabolischen Veränderungen, rücken in diesem Zusammenhang das Fettgewebe als Speicherorgan und in seiner Funktion als endokrines Organ in den Vordergrund der Betrachtung. Im Mittelpunkt dieser Forschung steht vor allem die Aufklärung der Interaktion von Fettgewebe und metabolisch aktiven Geweben, wie dem Myokard und damit verbunden die Auswirkungen einer entstehenden myokardialen Lipotoxizität auf kardiale Alterungsprozesse.

Gegenstand dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses des Alters auf eine diätinduzierte Lipidüberlast im murinen Tiermodell. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen neben der Analyse myokardialer Lipidakkumulation, die Expression von Schlüsselenzymen des Glukose- und Fettstoffwechsels, der Einfluss auf die mitochondriale Biogenese sowie Mitochondrien- und Herzfunktion. Des

Weiteren wurde die Wirkung einzelner Fettsäuren in vitro auf die Aktivität zentraler metabolischer Schlüsselfaktoren untersucht.

5.1 Tierversuch

5.1.1 Einfluss Fütterung fettreicher Nahrung auf Körper- und Organgewicht

5.1.1.1 Körper- und Organgewichte

Für den Fütterungsversuch wählten wir C57Bl/6-Mäuse, da diese von einigen Gruppen (Surwit et al. 1988; Winzell and Ahren 2004) als ein geeignetes Modell für die Untersuchung des Einflusses fettreicher Nahrung auf Adipositas, Hyperglykämie, Glucose-Intoleranz, Insulin-Resistenz etc. beschrieben wurden. So handelt es sich bei diesem Mausstamm um eine Inzuchtlinie mit konstantem genetischen Hintergrund, der insbesondere dadurch gekennzeichnet ist, dass die Tiere anfällig für diätinduzierte Adipositas sind (Surwit et al. 1995).

Gegenüber jungen Tieren weisen alte Tiere der HD- und HF-Gruppe ein höheres Leber- und LV-Gewicht auf. Wie wir nachweisen können, sind die erhöhten Gewichte der Leber tatsächlich auf Lipideinlagerungen zurückzuführen (vgl. 4.2 und 5.1.1.2). Dies ist als typische Alterserscheinung zu werten (Jackson and Wenger 2011) und kann durchaus durch Fibrosierung bedingt sein. Vergleicht man die LV-Gewichte innerhalb der Altersgruppen, so finden wir unter dem Einfluss der HF-Diät die Gewichte der Herzen bzw. des LV der alten Tiere bereits nach 6 Wochen leicht vermindert. Nach weiteren 8 Wochen Fütterung fettreicher Diät sind die Gewichte der linken Ventrikel der HF-Gruppe deutlich gegenüber denen der HD-Gruppe verringert. Bereits Okere et al. diskutierten die hohe Konzentration von Palmitat in der verabreichten Diät als Grund für die ausbleibenden Gewichtszunahmen des LV bei den Versuchstieren (Okere et al. 2006). Indem Palmitat das Ausgangsprodukt der de-novo Synthese von Ceramiden darstellt, welche pro-apoptotisch wirken, kann dies möglicherweise die Apoptose von Kardiomyozyten auslösen. Da die von uns verabreichte HF-Diät als Hauptenergiequelle Palmitat beinhaltet, wäre das verringerte LV-Gewicht der Tiere der HF-Gruppe im Vergleich zur HD-Gruppe möglicherweise mit der Apoptose von Kardiomyozyten zu erklären. Denkbar ist aber auch ein Ceramid-unabhängiger Weg der Apoptose-Aktivierung, wobei reaktive Oxygenspezies hierbei als Mediatoren im Vordergrund stehen (Listenberger et al. 2001).

5.1.1.2 Lipideinlagerung und Analyse der Serum-Triglycerid- und Fettsäurespiegel

Klinische Studien und Tierversuche zeigten, dass eine verstärkte intrazelluläre Lipidakkumulation bei der Entstehung von Herzerkrankungen, Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes eine Rolle spielt (Zhou et al. 2000; Schaffer 2003). Das gesunde Herz, welches seinen Großteil der Energie (60 – 70 %) durch die Verstoffwechselung von Fettsäuren gewinnt, stellt damit ein Gewebe hoher Stoffwechselaktivität und Ausgangspunkt möglicher Alterungserscheinungen dar (Rosca and Hoppel 2010). Untersuchungen zeigten, dass vor allem gesättigte Fettsäuren zu einer stärkeren Akkumulation von Triglyceriden in den Geweben führen (Videla et al. 2004). Im Rahmen unseres Fütterungsversuches ist im LV der alten Tiere deutlich eine Einlagerung von Triglyceriden in Form von Fetttropfchen zu beobachten. Sharma et al. beobachteten eine ebensolche Fetteinlagerung bei Patienten mit Herzerkrankungen bei vorliegenden diabetischen und/oder adipösen Erkrankungen (Sharma et al. 2004). Wie Akki und Seymour bei Studien mit Ratten beschrieben, verstärkt eine vorliegende Adipositas in Kombination mit linksventrikulärer Hypertrophie das Fettsäureangebot im Myokard. Eine folgende Dysregulation des Fettstoffwechsels bedingt eine Fettakkumulation (Akki and Seymour 2009) im Gewebe. Die durch solche intramyozellulären Lipide verursachten Dysfunktionen führen zur Lipotoxizität. Ebenfalls hiervon betroffen ist häufig die Leber, die als Fettstoffwechselorgan Ort der Synthese von Cholesterol und Triglyceriden ist. Bei einer vorliegenden Lipotoxizität erhöht sich der Fettgehalt auch in der Leber (normal < 5 % w./w.) und ist häufig verbunden mit dem Auftreten einer Insulinresistenz (Kotronen et al. 2008). Verschiedene Studien haben bereits belegt, dass die Fütterung einer HF-Diät zu ebensolchen metabolischen und strukturellen Veränderungen führen kann (van Herpen and Schrauwen-Hinderling 2008). Dennoch gibt es auch gegenteilige Ergebnisse, wobei fettreiche Diäten protektive Wirkungen in Studien zeigten. Rennison et al. wiesen postinfarkt bei Ratten unter HF-Diät eine erhöhte Aktivität der Atmungskettenkomplexe nach und somit eine gesteigerte mitochondriale oxydative Phosphorylierung (Rennison et al. 2007). Jedoch konnten sie keine Auswirkungen auf die Kontraktilität nachweisen. Sie vermuteten, dass die hohen Fettsäure- und Triglycerid-Spiegel PPAR α aktivieren und auf diesem Weg die Fettsäureoxidation und Atmung steigern (Rennison et al. 2007).

Die von uns nachgewiesene deutlich erhöhte Konzentration an freien Fettsäuren im Serum junger und alter Tiere der HF-Gruppe könnte dafür sprechen. Aber eine Akkumulation dieser im Metabolismus kann auch ein Zeichen für eine beginnende lipotoxische Wirkung der fettreichen Diät sein. Dies stellten auch Chandler et al. bei

diabetischen Ratten unter HF-Diät fest (Chandler et al. 2007). Jedoch fanden sie, dass trotz erhöhter Plasma-Fettsäurespiegel die mitochondrialen Triglycerid-Level unverändert im Myokard waren (Chandler et al. 2007). Die von uns beobachteten nur wenig erhöhten Triglycerid-Spiegel können auf die Fettsäurezusammensetzung der Diät zurückzuführen sein (Okere et al. 2006). Wie Okere et al. zeigten, wurden mittelkettige Fettsäuren nicht zu Triglyceriden verstoffwechselt und eine Fütterung von Ratten über einen Zeitraum von 8 Wochen mit einer Diät reich an ungesättigten Fettsäuren zeigte niedrige Plasmatriglyceridspiegel. Der daraus resultierende Triglyceridgehalt des Myokards variierte je nach Anteil der Fettsäuren. Resultierend daraus beobachteten sie eine zunehmende Einschränkung der kontraktilen Funktion (Chandler et al. 2007). Vikramadithyan et al. bezeichnete den Plasma-Triglyceridspiegel als den limitierenden Faktor für die myokardiale Lipidaufnahme (Vikramadithyan et al. 2005). Die von uns gemessenen gering gestiegenen Plasmatriglyceridspiegel bestätigen diese Theorie, da auch wir keine Gewichtszunahme des LV aufgrund von Lipideinlagerung nachweisen konnten.

5.1.2 Charakterisierung der ventrikulären Funktion

Die echokardiographische Charakterisierung der Herzfunktion (vgl. 4.3) zeigt eine Abnahme des diastolischen Parameters LVDd (Innendurchmesser des linken Ventrikels) mit Zunahme des Fettanteils im Futter sowohl in der Gruppe der jungen, als auch in der Gruppe der alten Tiere (Abb. 4-7). Diese Verringerung des Innendurchmessers des linken Ventrikels lässt eine verminderte Dehnungsfähigkeit des Gewebes vermuten, die möglicherweise durch Kollageneinlagerungen bewirkt wird.

Dafür sprechen auch die von uns ermittelten deutlich erhöhten Gewichte (vgl. Tab. 4-1) der linken Ventrikel der alten Tiere gegenüber den jungen Tieren. Dies deutet auf eine altersbedingte Kollageneinlagerung im LV der alten Tiere hin.

Da die alten Tiere der HF-Gruppe zusätzlich eine deutliche Reduktion der E/A-Ratio gegenüber den Tieren der HD-Gruppe aufweisen, können wir auf eine beginnende diastolische Dysfunktion schließen. Somit beschleunigt die Fütterung einer fettreichen Diät die Entwicklung einer diastol. Dysfunktion in den alten Tieren. Diese strukturellen Veränderungen sind auch auf molekularer Ebene nachweisbar. Im Gewebe der alten Tiere der HF-Gruppe ist ein signifikanter Anstieg der Kollagengene COL I und COL III in ihrer Expression zu beobachten (Abb. 4-9). Weiterführende Untersuchungen zeigen, dass dieser Expressionsanstieg mit einer Kollageneinlagerung im LV-Gewebe einhergeht (Aurich et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Gewebe Kollagenfasern, gebündelt in Form von Fibrillen, die zunehmende Steifigkeit des

Myokards bedingen und sich eine Dysfunktion ausbildet (de Jong et al. 2012). Einhergehend mit diesen strukturellen Veränderungen findet man zudem oft eine Hypertrophierung des myokardialen Gewebes (de Souza 2002). Diese können wir im Gewebe der alten Tiere der HD-Gruppe im Vergleich zu den jungen Tieren der HD-Gruppe nachweisen. Zusätzlich ist die Hypertrophierung unter dem Einfluss der HF-Diät (vgl. Abb. 4-14) in der Gruppe der alten Tiere verstärkt. Hypertrophierung wird induziert durch den Untergang von Myozyten und die darauf folgende adaptive Hypertrophie der verbleibenden Myozyten bei gleichen Lastbedingungen (Olivetti et al. 1991; Ferrari et al. 2009). Mikroskopisch zu beobachten ist dabei eine Vergrößerung der verbleibenden Myozyten (zelluläre Hypertrophie) sowie ein Ersatz der untergegangenen Kardiomyozyten durch Fibroblasten (Olivetti et al. 1991; Ferrari et al. 2009). Langfristige Folge der myozytären Hypertrophie sind eine abnehmende Kontraktilität der Myozyten (Chiamvimonvat 2002) und die verminderte Fähigkeit in Stresssituationen wie Ischämie adäquat zu reagieren (Sadek 2003; Simkhovich et al. 2003).

Auch eine molekularbiologische Analyse überlastinduzierter Marker wie ANP und BNP deutet auf den Funktionsverlust des LV der alten Tiere der HF-Gruppe hin. So sind nach bereits 6 Wochen Fütterung von HF-Diät sowohl ANP als auch BNP induziert (vgl. Abb. 4-11).

In der Gruppe der jungen Tiere der HF-Gruppe dagegen scheint die kardiale Funktion keine Beeinträchtigung aufzuweisen (vgl. Abb. 4-7 und 4-8). Dies lässt vermuten, dass die Adaptation an die erhöhte Lipidlast in den jungen Tieren erfolgreicher verlaufen ist. Die Analyse von überlastinduzierten Markern dagegen, wie ANP und BNP, zeigt eine moderate Induktion der mRNA. Bei beginnender Ausbildung einer Dysfunktion werden die überlastinduzierten Marker ANP und BNP zunehmend ausgeschüttet. So findet man in Patienten mit instabiler Angina, Bluthochdruck hypertropher Kardiomyopathie erhöhte Plasmakonzentrationen an BNP. Im Fall eines Myokardinfarktes steigen die Plasma-Konzentrationen in kurzer Zeit stark an (Morita et al. 1993). Aus diesem Grund ist BNP ein etablierter Marker bei der Untersuchung von Patienten und bietet somit auch die Erkennung symptomloser linksventrikulärer Dysfunktionen (McMurray et al. 2012).

Die Expressionsanalyse von ANP und BNP zeigen, dass bereits nach 6 Wochen fettreicher Fütterung eine beginnende kardiale Überlast in beiden Gruppen nachweisbar ist. Auch de Boer et al. wiesen eine positive Korrelation der Expression dieser Marker mit der Ausbildung einer Herzinsuffizienz sowie eine negative Korrelation für die Kalzium-Pumpe SERCA2 im myokardialen Gewebe von Patienten nach (de Boer et al. 2001). Nach 14 Wochen Versuchsdauer zeigt sich auch in unseren

Analysen, dass die myokardspezifische Kalzium-Pumpe SERCA2 verringert exprimiert wird (Abb. 4-12), was auf eine Progredienz der Dysfunktion hindeutet (de Boer et al. 2001). Da nur bei den alten Tieren eine verstärkte Kollagenexpression nachgewiesen werden konnte, muss der beginnende dysfunktionelle Zustand des Myokards der jungen Tiere auf andere pathophysiologische Ursachen zurückzuführen sein. Möglicherweise ist nach 6 oder 8 Wochen noch keine kontraktile Dysfunktion nachweisbar, aber die durch die fettreiche Diät ausgelösten Signalkaskaden und Umstellungen des myokardialen Stoffwechsels führen chronisch zu einem Funktionsverlust. Die von uns nachgewiesene verminderte Expression von SERCA2 im LV nach 14 Wochen fettreicher Fütterung könnte beispielsweise zu einem verminderten Kalziumtransport ins Sarkoplasmatische Retikulum (SR) und so zu Störungen des Kontraktions- und Relaxationsvorganges führen. Dieser Transportvorgang ins SR ist schnell und energieaufwendig und wird mit zunehmendem Alter langsamer und behindert das Relaxationsverhalten (Nguyen et al. 2001) des Herzens. Dies führt zur Abnahme der Erschlaffungsfähigkeit (Varagic et al. 2001), was neben dem erhöhten Kollagengehalt zur diastolischen Dysfunktion beiträgt, sichtbar u.a. im gestörten E/A-Verhältnis.

Ein Überangebot an Fettsäuren kann aber auch zu einer Entkopplung der Atmungskette über UCP3, einem energetisch primär maladaptiven Zustand, führen und einen Funktionsverlust des Myokard begünstigen (Murray et al. 2005). Andererseits gibt es auch Daten, wonach eine milde Entkopplung der Atmungskette zu einer verminderten mitochondrialen ROS-Bildung führt (Miwa and Brand 2003). Damit könnte es sich auch um einen primär nicht maladaptiven Zustand, betreffend die Gruppe der jungen Tiere, handeln.

5.1.3 Stoffwechselanalyse

Zur Beschreibung der Stoffwechselsituation im Myokard analysieren wir verschiedene PPAR α -regulierte Schlüsselgene des Glucose- und Fettstoffwechsels und der mitochondrialen Biogenese im LV, in der Leber und im Fettgewebe.

5.1.3.1 PPARalpha und seine Target-Gene

Auffallend ist die unterschiedliche metabolische Reaktion der Tiere auf die angebotene fettreiche Diät mit zunehmendem Alter. So bleiben die PPAR α -Zielgene (Abb. 4-15) im LV der jungen Tiere der HF-Gruppe in ihrer Expression nahezu unbeeinflusst. Dagegen finden wir bei den alten Tieren der HF-Gruppe eine signifikante Expressionsinduktion verschiedener PPAR α -Zielgene wie CD36, PGC1 α , CPT1, und UCP3. Die Expressionsinduktion von CD36 und CPT1 gibt einen möglichen Hinweis

auf einen gesteigerten Fettstoffwechsel, da die im Serum vorhandenen freien Fettsäuren über beide Transporter der Fettsäureoxidation in den Mitochondrien der Kardiomyozyten zugeführt werden (Lopaschuk et al. 2010). Da auch die jungen Tiere hohe Fettsäure-Spiegel im Serum aufweisen, überrascht die fehlende Induktion von PPAR α und seinem Koaktivator sowie die verminderte Expression des UCP3 unter HF-Diät. Im Gegensatz dazu beschrieben Choi et al. eine Expressionsinduktion von UCP3 unter HF-Diät (Choi et al. 2007), die Cole et al. im Myokard von HF-gefütterten Ratten bestätigten und zusätzlich die damit verbundene erhöhte Expression von MTE1 via PPAR α -Aktivierung nachwiesen (Cole et al. 2011). Eine Expressionsinduktion von MTE1 ist im Myokard der alten Tiere der HF-Gruppe nachweisbar (vgl. Abb. 4-16). Dies bestätigt die Beobachtungen von Cole et al. und lässt vermuten, dass MTE1 und UCP3 gemeinsam agieren, um die Lipidperoxide aus der mitochondrialen Matrix auszuschleusen (Cole et al. 2011). Verschiedene Hypothesen bewerten die Expressionssteigerung von UCP3 als Schutzmechanismus bei der Entstehung von Lipotoxizität (Goglia and Skulachev 2003; Schrauwen and Hesselink 2003). So beschrieben Ho et al., dass Fettsäuren bei hohen Plasmakonzentrationen via eines Flip-Flop-Mechanismus in die mitochondriale Matrix gelangen (Ho et al. 2002). Dort liegen diese dann in der Matrix als Anionen vor und können nicht verstoffwechselt werden (Ho et al. 2002). In Form von Anionen sind Fettsäuren besonders anfällig für ROS, die diese in hochreaktive Lipidperoxide verwandeln und somit Schädigungen von mitochondrialer DNA, RNA und Proteinen bedingen können (Anderson et al. 2012). Damit würden hohe Konzentrationen an Fettsäuren einen Funktionsverlust des Myokards durch Entkopplung der Atmungskette (Hoeks et al. 2006) und durch die chronische Toxizität hoher ROS-Konzentrationen bedingen (Byrne et al. 2003; Lorenzo et al. 2013). Basierend auf diesen Erkenntnissen postulierten Schrauwen et al. eine Fettsäure-Exportfunktion für UCP3 (Schrauwen et al. 2001). Damit wäre die Expressionsinduktion von MTE1 und UCP3 im LV der alten Tiere unter HF-Diät als Schutzmechanismus vor lipotoxischen Auswirkungen der hohen Fettsäurekonzentration im Plasma zu deuten.

Insgesamt betrachtet, ist die Aktivierung von PPAR α und seinen Target-Genen in der HF-Gruppe der alten Tiere jedoch nur geringfügig und im LV der jungen Tiere nicht nachweisbar. Morgan et al. beobachteten ebenfalls eine fehlende PPAR α -Aktivierung und führten dies auf die Fettsäure-Kombination der verabreichten Diät zurück (Morgan et al. 2006). Sie schlussfolgerten, dass die vorwiegend gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren verschiedener Kettenlänge möglicherweise zu inadäquat für eine optimale Aktivierung von PPAR α sind (Morgan et al. 2006). Auch die von uns

verabreichte Diät besteht vorwiegend aus dieser Fettsäurezusammensetzung. Dies ist möglicherweise auch der Grund für die fehlende Auswirkung auf die Expression der Target-Gene im LV der jungen Tiere der HF-Gruppe. Da das Herz junger Tiere seinen ATP-Bedarf zu 70% aus Fettsäuren deckt (Hue and Taegtmeyer 2009) und eher in der Lage ist, zwischen verschiedenen Substraten umzuschalten (Stanley et al. 2005), kann ein Überangebot an Fettsäuren auch besser toleriert werden. Dies könnte bedeuten, dass die physiologische Konzentration der Fettsäuren im Gewebe nicht ausreichend für eine Aktivierung der Expression von PPAR α und seinen Target-Genen ist.

Im Gegensatz zu den jungen Tieren steht die metabolische Reaktion der alten Tiere. Hier erfolgt die Energiegewinnung vorrangig durch glykolytische Stoffwechselvorgänge (McMillin et al. 1993) und bereits geringe Fettsäurekonzentrationen im Gewebe bewirken die Expressionsinduktion von „Stoffwechselschaltern“ wie PPAR α oder PGC1 α . Wu et al. führten die geringe metabolischen Reaktion der Tiere zudem auf das Alter sowie unterschiedliche Entzündungsprozesse im Gewebe der Tiere zurück (Wu et al. 2013).

5.1.3.2 ACO, ACC2 und MCAD – Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels

Insgesamt betrachtet, wirkt sich die Fütterung der HF-Diät nur leicht auf die Expression dieser Schlüsselenzyme des Fettstoffwechsels aus. Mit zunehmendem Alter der Tiere ist sowohl für ACO als auch ACC2 eine Reduktion in der Expression beider Gene im LV nachweisbar. Jedoch finden wir nach 14 Wochen fettreicher Diät eine Expressionsinduktion für ACC2 in LV und Leber (Abb. 4-17B). Die Induktion von Schlüsselenzymen des Fettstoffwechsels resultiert vermutlich aus den erhöhten Plasma-Fettsäurespiegeln (vgl. 4.2 Abb. 4-6) oder aus den mit der verwendeten HF-Diät zugeführten Fettsäuren, insbesondere Palmitat. So beschrieben Matsui et al. eine Induktion der Fettsäureoxidation in Kardiomyozyten unter Palmitatbehandlung (Matsui et al. 2012) und damit einen Substratshift von Glucose zu Fettsäuren. Als Erklärung führten sie die Inhibierung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) aufgrund der erhöhten Fettsäureoxidation an (Patel and Korotchkina 2006).

Neben der Reduktion der ACO ist auch die Expression von ACC2 im LV alter Tiere der HD-Gruppe reduziert. Eine Reduktion beider Enzyme scheint für eine Herunterregulation des Fettstoffwechsels mit zunehmendem Alter zu sprechen. Dies deckt sich auch mit dem in der Literatur beschriebenen Substrat-Shift des gealterten Myokards hin zu einem glykolytischen Stoffwechsel (McMillin et al. 1993). Nach 14 Wochen Fütterung der fettreichen Diät und somit einer Anreicherung von Fettsäuren im Metabolismus können wir eine Steigerung der MCAD-Enzymaktivität, vermutlich begründet in einer Expressionsinduktion, bei den alten Tieren beobachten. So ist

anzunehmen, dass es aufgrund des Überangebotes an Fettsäuren, zu einer Steigerung der Fettsäureoxidation und damit zu einem Substrat-Shift im LV alter Tiere, induziert durch HF-Diät, kommt. Die Expressionsinduktion von ACC2 im LV alter Tiere unter HF-Diät stellt hier möglicherweise einen Regulationsmechanismus für die Fettsäureaufnahme in die Mitochondrien dar, um Lipotoxizität vorzubeugen (Dyck and Lopaschuk 2002).

Andererseits könnte auch die FS-Komposition der Diät ein Grund für die fehlende lipotopoxische Wirkung im Organismus der Tiere sein (Rennison et al. 2007). Rennison et. al. beobachteten dies bei Fütterungsversuchen mit Ratten (Rennison et al. 2007). Trotz Akkumulation myokardialer Triglyceride und Ceramide war die LV Kontraktilität nicht beeinflusst (Rennison et al. 2007)

Darüber hinaus konnten Okere et al bei Fütterung einer Diät, die Linolsäure und mittelkettige Fettsäuren enthält, zeigen, dass hier kein Anstieg kardialer Triglyceride zu verzeichnen ist. Sie schlussfolgerten daraus, dass der intrakardiale Triglyceridstoffwechsel sowohl von der FS-Zusammensetzung als auch der Kettenlänge der Fettsäuren in der verabreichten Diät abhängt (Okere et al. 2007).

Denkbar ist auch ein Einfluss der in der Diät zu kleinen Anteilen enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (DHA/EPA). Klinische Studien haben die Triglyceridsenkenden Effekte von DHA und EPA aufgezeigt (Grimsgaard et al. 1997). Die stärkere Wirkung liegt hierbei bei DHA.

Grimsgaard et al. wiesen zudem nach, dass n-3 PUFAs vermutlich einen starken positiven Effekt auf die Phospholipid-Komposition der Mitochondrienmembran haben, was in einer gesteigerten mitochondrialen Funktion und Stressresistenz resultiert (Grimsgaard et al. 1997).

5.1.3.3 SCD1, SCD4

Der hohe Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren (ca. 45 %), wie Oleat in der verabreichten HF-Diät ist vermutlich die Ursache für die tendenzielle Expressionsreduktion der Stearoyl-CoA-Desaturasen SCD1 und SCD4 (vgl. 4.4.1.4) im LV der HF-Gruppen. Wie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Rohrbach 2009; Nicholson et al. 2013), wirken ungesättigte Fettsäuren protektiv im Organismus und einer Lipotoxizität entgegen. Listenberger et al. wiesen bei in vitro Studien nach, dass die Zugabe ungesättigter Fettsäuren ins Medium die Palmitat-induzierte Apoptose aufhebt und durch Abtransport der Palmitinsäure via SCD1 in den TG-Pool (Peter et al. 2009) und von der Ceramidsynthese weg einer lipotoxischen Wirkung vorbeugt (Listenberger et al. 2003).

Neben einem Großteil an einfach ungesättigten Fettsäuren beinhaltet die von uns verwendete HF-Diät auch einen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren (ca. 20 %). Schon Miyazaki et al. wiesen in Studien nach, dass eine kurzzeitige Behandlung von Mäusen mit einer Diät reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren keine Auswirkungen auf die Expression von SCD4 hatte (Miyazaki and Ntambi 2003). Da SCD4 im Herz Leptin-defizienter (*ob/ob*)-Tiere induziert ist, konnten Cohen et al. durch Leptin-Behandlung der Tiere und der daraus resultierenden Expressionsreduktion, SCD4 als Target von Leptin identifizieren (Cohen et al. 2002). Miyazaki et al. schlussfolgerten daraus, dass SCD4 für die Akkumulation von Triglyceriden im Myokard verantwortlich ist (Miyazaki et al. 2003). Die von uns gemessenen hohen Serum-Leptinwerte (Abb 4-20) können daher der Grund für die Herunterregulation der Desaturasen unter dem 14-wöchigen Einfluss der fettreichen Diät sein. Möglicherweise ist dies ebenfalls ein Schutzmechanismus vor Lipidakkumulation im LV, welcher aus der hohen Fettsäurekonzentration im Serum resultieren würde.

5.1.4 Adiponektin-vermittelte AMPK-Aktivierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsanalysen der Adipokine und AMPK-Aktivatoren Adiponektin und Leptin im Fettgewebe durchgeführt sowie die Serumspiegel bestimmt. Deutlich lässt sich unter dem Einfluss der HF-Diät in beiden Altersgruppen eine verstärkte Expression von Leptin und daraus resultierende hohe Serumspiegel nachweisen. Dies korreliert mit dem in beiden Gruppen erhöhten Gewicht aufgrund der HF-Diät und lässt auf einen adipösen Zustand schließen (Hou and Luo 2011). Adiponektin dagegen ist trotz unveränderter Expression im Serum der HF-Gruppen verringert (Abb. 4-20) und kann somit die Ursache für eine fehlende AMPK-Aktivierung (Abb. 4-26) darstellen.

Leptin als Fettgewebshormon und Adipositas-Signal (Zhou and Rui 2013) kann nach Injektion eine Phosphorylierung und Aktivierung der α 2AMPK-Untereinheit bewirken und somit zur Hemmung der ACC und Induktion der β -Oxidation führen (Minokoshi and Kahn 2003). Trotz der hohen Serumkonzentration an Leptin können wir keine Aktivierung der AMPK in der Leber nachweisen. Stattdessen zeigt sowohl in der HF-Gruppe der jungen als auch der alten Tiere die AMP-aktivierte Proteinkinase eine Dephosphorylierung, was auf eine Aktivitätsminderung hindeutet. Verschiedene Studien zeigten, dass eine mögliche Ursache der Inhibierung der AMPK in zu hohen Insulin-Serumspiegeln begründet sein kann (Beauloye et al. 2001; Kovacic et al. 2003). Insulin bewirkt nachweislich eine verminderte Phosphorylierung des katalytisch aktiven Zentrums der AMPK (Beauloye et al. 2001).

Gleichzeitig kann der bereits nach 6-wöchiger Fütterung (nicht gezeigt) beobachtete hohe Insulin-Serumspiegel auch auf ein kardiometabolisches Syndrom (Hecker et al. 2011) mit einhergehender Insulin-Resistenz hindeuten. Hierbei ist deutlich ein Unterschied zwischen den jungen und alten Tieren der HF-Gruppen zu verzeichnen (Abb. 4-20). So weisen die Serumspiegel der alten Tiere nach 14 Wochen Versuchsdauer die nahezu doppelte Menge an Insulin und Leptin im Vergleich zu den jungen Tieren der HF-Gruppe bei ähnlich niedrigen Werten der HD-Gruppen auf.

Wie bereits in verschiedenen Adipositas-Modellen beobachtet, deuten hohe Insulin-Serumkonzentrationen auf eine verringerte Insulinsensitivität hin und gehen einher mit signifikant reduzierten Adiponektin-Konzentrationen (Hotta et al. 2000; Hotta et al. 2001). Somit kann ein verminderter Adiponektin-Serumspiegel eine reduzierte Aktivierung der AMPK begründen (Shibata et al. 2004). In den von uns untersuchten Gruppen an Mäusen finden wir eine signifikante Reduktion des Adiponektin-Serumspiegels mit zunehmendem Alter sowie unter dem Einfluss fettreicher Diät (Abb. 4-20). Barnea et al. führten dies auf eine Expressionsreduktion von Adiponektin im Fettgewebe nach 16-wöchiger Fütterung 4 Wochen alter C57Bl/6J-Mäuse mit fettreicher Diät zurück (Barnea et al. 2006). In Rattenmodellen konnten wir ebenfalls eine verminderte acrp30 Expression im Fettgewebe und reduzierte AMPK-Aktivierung im LV beobachten (Rohrbach et al. 2007). Expressionsanalysen visceralen Fettgewebes der alten und jungen Tiere der untersuchten Fütterungsgruppen zeigen in unserer Studie jedoch keine signifikanten Unterschiede der Expression von acrp30. Die dennoch reduzierten Serumspiegel lassen auf eine Regulation des Adiponektins auf Proteinebene schließen.

Einhergehend mit der Reduktion der Adiponektin-Serumspiegel können wir nach 14 Wochen HF-Diät eine Reduktion von AR1 im LV sowohl der jungen als auch der alten Tiere unter HF-Diät nachweisen (Abb. 4-22). AdipoR2 zeigt sich in seiner Expression sowohl in der Leber als auch im LV unbeeinflusst. In der Literatur findet man hierzu widersprüchliche Angaben. So beobachteten Barnea et al. eine Reduktion der Adiponektin-Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 in der Leber und eine Induktion im Muskel nach Fütterung von C57Bl/6 Mäusen mit fettreicher Diät (Barnea et al. 2006). Beylot et al. dagegen beobachteten trotz niedriger Adiponektin-Serumspiegel keinerlei Expressionsänderung in Muskel, Leber oder FG diabetischer Ratten (Beylot et al. 2006). Außerdem hatten weder fettreiche Nahrung noch Fasten darauf einen Einfluss (Yao et al. 2005; Beylot et al. 2006).

Neben der von uns ermittelten verminderten Expression des Rezeptors AdipoR1 im LV der Mäuse der HF-Gruppe können wir auch für den Adiponektin-Korezeptor t-Cadherin eine Expressionsreduktion nachweisen. Damit ist die von uns beobachtete verminderte AMPK-Aktivierung in der Leber möglicherweise nicht nur die Folge der gesunkenen Konzentration zirkulierenden Adiponekins im Serum sondern auch in der verminderten Expression von AdipoR1 begründet. Wie Iwabu et al. vermuteten und Denzel et al. mit Hilfe von t-Cadherin-KO-Mäusen bewiesen, ist t-Cadherin essentiell für die Bindung von Adiponektin an AdipoR1 und AdipoR2 und die Aktivierung des downstream Targets AMPK (Denzel et al. 2010; Iwabu et al. 2010). Damit ist die verringerte Adiponektin-Verfügbarkeit vermutlich in der Reduktion von tCadherin begründet. Wie Yamauchi et al. nachwiesen, bewirkt eine Bindung von Adiponektin an die Rezeptoren AdipoR1 und AdipoR2 eine Aktivierung von AMPK- und PPARalpha-Signalwegen und beeinflusst somit regulierend durch Steigerung der Insulinsensitivität eine Steigerung der Fettsäureoxidation und Glucoseaufnahme und wirkt so regulierend auf den gesamten Metabolismus (Yamauchi et al. 2014).

Neben Adiponektin sind auch die CTRPs in der Lage die AMPK zu aktivieren. Jedoch zeigen beide in dieser Arbeit untersuchten CTRPs, CTRP2 und CTRP7, kaum eine Expressionsänderung im LV der Tiere unter HF-Diät (Abb. 4-24). Lediglich CTRP7 zeigt eine leichte Expressionsinduktion unter HF-Diät in der Gruppe der alten Tiere. Ein kompensatorischer Effekt von CTRP2 und CTRP7 für das Adiponektindefizit im LV ist daher unwahrscheinlich. Neuste Untersuchungen identifizieren weitere Mitglieder der CTRP-Gruppe (CTRP1, CTRP3, CTRP12, CTRP15) als mögliche Fettstoffwechsel-beeinflussende Kandidaten. Für CTRP1 wurde eine erhöhter Serumspiegel in Adiponektin-Knockout-Mäusen nachgewiesen, was auf einen kompensatorischen Effekt für Adiponektin hinweisen könnte (Wong et al. 2008). Peterson et al. wiesen mittels CTRP3-transgener Mäuse nach, dass diese unter Verabreichung einer HF-Diät keine Fettleber entwickelten. Eine Applikation von rekombinantem CTRP3 auf Leberzellen reduzierte zudem nachweislich die Fettsäuresynthese sowie die Lipidakkumulation in den Zellen (Peterson et al. 2013). CTRP12 dagegen agiert anti-diabetisch und beeinflusst vorrangig den Glucosestoffwechsel in Fettgewebe und Leber (Wei et al. 2012). Für CTRP15, aufgrund seiner spezifischen Expression (Skelett-/Herzmuskel) als Myonectin bezeichnet, konnten Seldin et al. nachweisen, dass es sehr stark auf metabolische Änderungen reagiert. So reduziert Fasten die mRNA und das zirkulierende Myonectin nachweislich, jedoch ohne Einfluss auf den Glucosestoffwechsel (Seldin et al. 2012). CTRP12 und CTRP15 sind auch nachweislich im adipösen, chronischen Zustand reduziert (Seldin et al. 2012; Wei et al. 2012). Diese Adipokine stellen damit neue Ansätze zur Untersuchung protektiver

Effekte vor Lipotoxizität dar und weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese einzeln oder im Zusammenhang das unter HF-Diät vorliegende Adiponektindefizit ausgleichen können.

5.1.4.1 Expressionsanalysen und Charakterisierung der Aktivierungszustandes der AMPK

Die semiquantitative Analyse der mRNA der AMPK-Untereinheiten im LV-Gewebe zeigt, dass die Fütterung einer fettreichen Diät die Expression der herzspezifischen Untereinheiten beta2 und gamma2 nicht signifikant beeinflusste. Auffällig dagegen ist die deutliche Downregulation der alpha2-Untereinheit im LV mit zunehmendem Alter, die jedoch durch Aufnahme fettreicher Diät nicht verstärkt wird. Da sich unter fettreicher Diät jedoch zeitgleich eine Minderung der AMPK-Enzymaktivität im Lebergewebe sowohl bei jungen als auch alten Tieren nachweisen lässt (Abb. 4-26), deutet dies auf eine gewebsspezifische Reaktion auf die erhöhten zirkulierenden Fette im Metabolismus hin.

Dagegen finden wir in der Gruppe der jungen Tiere eine auffällige Expressionsminderung der alpha2-Untereinheit im LV unter fettreicher Diät. Die Aktivierung der AMPK erfolgt über die Phosphorylierung der Aminosäure Thr172 der alpha-Untereinheit (Young et al. 2005). Die ermittelte Reduktion der Expression dieser Untereinheit bedingt somit eine Reduktion an AMPK-Molekülen im Metabolismus. Zusammen mit der Reduktion der AMPK-Enzymaktivität im Lebergewebe zeichnet sich hier ein Einfluss der fettreichen Diät auf den gesamten Metabolismus ab.

Da wir die damit verbundene Phosphorylierungsminderung der ACC und eine damit verbundene Aktivitätssteigerung (Long and Zierath 2006) im Lebergewebe beider fettreich gefütterten Gruppen nicht nachweisen können (Abb. 4-26), ist von einer verringerten Aktivität der ACC im Lebergewebe der HF-Gruppen auszugehen, was in einer verringerten Malonyl-CoA-Synthese resultiert. Dementsprechend ist der Fettsäuretransporter CPT1 nicht blockiert und führt zu einer Akkumulation von Fettsäuren im Mitochondrium. Daraus können wir schlussfolgern, dass die von uns beobachtete Dephosphorylierung der AMPK zu einer intrazellulären Akkumulation von Fettsäuren führen wird, die chronisch eine Lipotoxizität in der Gruppe der HF-gefütterten Tiere bedingt. Auch Turdi et al. beobachteten im Mykard AMPK-defizienter Mäuse eine Verstärkung von Adipositas, Glucose-Intoleranz, kardialer Hypertrophie und kardialer Dysfunktionen nach 20 Wochen Fütterung einer HF-Diät. Sie postulierten eine essentielle Rolle der AMPK bei Adipositas-bedingter Beeinträchtigung der Fettsäureoxidation und der Entwicklung einer Insulinresistenz (Turdi et al. 2011).

5.1.5 Mitochondriale Biogenese und Funktion

Zur Charakterisierung der mitochondrialen Biogenese und Funktion wählten wir PGC1 α , als zentralen Regulator mitochondrialer Biogeneseaktivität (Duncan et al. 2007), und die von diesem beeinflussten primären mitochondrialen Transkripte NRF1 und Tfam (Huss and Kelly 2005). Mit zunehmendem Alter stellen wir in weiterführenden Untersuchungen eine messbare Reduktion an mitochondrialer DNA (nicht gezeigt) und eine Expressionsverminderung einiger der genannten Gene (Abb. 4-27) fest. Boffoli et al. beschrieben ebenfalls im humanen Muskelgewebe eine Reduktion der Atmungskettenkomplexe I und IV mit zunehmendem Alter (Boffoli et al. 1994). Bedingt durch die verringerte Expression, reduziert sich die Anzahl an Atmungskettenkomplexen (Mootha et al. 2003; Patti et al. 2003) und führt somit zu einer sinkenden Enzymaktivität, welche wir ebenfalls mit zunehmendem Alter der Tiere beobachten (ohne Abbildung). Auch müsste man aufgrund der nachweisbaren Expressionsinduktion von NRF1 unter HF-Diät im LV beider Gruppen auf eine Induktion der mitochondrialen Biogenese und Induktion von Stoffwechselgenen schließen (Huss and Kelly 2005). NRF1 als nukleärer Transkriptionsfaktor reguliert neben der Expression von Atmungskettenkomplexgenen (Scarpulla 2002) die Expression des mitochondrialen Transkriptionsfaktors Tfam (Wu et al. 1999). Wie erwartet, finden wir Tfam im LV der alten Tiere unter der fettreichen Diät induziert vor. Überraschenderweise jedoch nicht in der Gruppe der jungen Tiere unter HF-Diät. Hier ist die Expression von Tfam deutlich reduziert. Dies ist möglicherweise auf die fehlende Aktivierung von PGC1 α zurückzuführen (vgl. Abb. 4-27 C).

Andererseits könnte die Expressionsinduktion von NRF1 auch mittels der hohen Serumfettsäurespiegel begründet werden. Da die AMPK inaktiviert ist, vermutlich begründet in den hohen Insulinserumspiegeln bei niedrigem acrp30 (Beauloye et al. 2001), erfolgt über diesen Weg keine Inhibierung der ACCbeta. Wie Adam et al. nachwiesen, scheint NRF1 durch Promotorbindung die myokardiale ACCbeta zu inhibieren (Adam et al. 2010). Somit würden über diese Regulation dennoch die Fettsäuren in die mitochondriale Matrix transportiert und der Fettsäureoxidation zugeführt.

Die verstärkte Expression von NRF1 in den Gruppen der fettreich gefütterten Tiere kann aber auch als eine Gegenreaktion auf den sinkenden Gehalt mitochondrialer DNA interpretiert werden. Über die Aktivierung von NRF1 wird die Expression von Tfam induziert, welcher als Transkriptionsaktivator der mitochondrialen Biogenese und von zentralen Stoffwechselgenen, betreffend den Fettstoffwechsel, fungiert (Rodgers et al. 2005). Die trotz erhöhter Expression von NRF1 verminderte Menge mitochondrialer DNA und Primärtranskripte sowie die sinkende Enzymaktivität können ihre Ursache

aber auch in einer erhöhten Produktion reaktiver Oxygenspezies (ROS) haben (Wallace 2005). So ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter die Produktion von ROS steigt und zu verstärkter Schädigung von mitochondrialer DNA führt, in deren Folge die Expression mitochondrialer Transkripte sinkt (Krishnan et al. 2007). Stoffwechsel-Ungleichgewichte, wie Hyperlipidämie, können zu Disproportionalitäten in der Atmungskette und zur Entstehung von ROS beitragen (Dirkx et al. 2011).

5.2 Zellversuche

Zur Klärung der metabolischen und signaltransduzierenden Wirkung der Fettsäuren wurden HEK293-Zellen mit einzelnen Fettsäuren und Kombination derer behandelt. Wir untersuchten die Wirkung von Palmitat (16:0) und Oleat (18:1), sowie Docosahexaensäure (DHA; 22:6), als eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, welche für ihre vorbeugende Wirkung auf die Entstehung von Insulin-Resistenz bekannt ist (Gonzalez-Periz et al. 2009) und somit einen gegenteiligen Effekt zu beispielsweise gesättigten Fettsäuren wie Palmitat aufweist.

Sowohl untransfizierte als auch α 2AMPK-überexprimierende HEK293-Zellen zeigen eine sowohl mit zunehmender Konzentration an Palmitat im Zellkulturmedium als auch zunehmender Dauer der Fettsäurebehandlung verstärkte Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der AMP-aktivierten Protein-Kinase (Abb. 4-31 und Abb. 4-34). Den gleichen Effekt beschrieben auch Wu et al. in BAEC (Bovine aortic endothelial cells)-Zellen bei der Behandlung mit Palmitat. Ab einer Konzentration von 400 μ mol Palmitat sahen sie einen Rückgang der Phosphorylierung (Wu et al. 2007). Aus weiteren Untersuchungen schlussfolgerten sie, dass Palmitat durch Aktivierung der Proteinphosphatase 2A (PP2A) die AMPK inhibiert (Wu et al. 2007). Dies bewirkt eine Aktivierung der ACC und verstärkte Bildung von Malonyl-CoA, welche wiederum zu einer Verminderung der Aktivität des Fettsäuretransporters CPT1 führt (Park et al. 2002). Die Folge ist eine Anreicherung von freien Fettsäuren im Zytoplasma. Wie Garcia-Roves et al. im Skelettmuskel von Wistar-Ratten nachweisen konnten, bedingt diese Anreicherung eine Induktion der mitochondrialen Biogenese, messbar anhand der Expressionsinduktion von Enzymen des Zitratzyklus, der Atmungskette und der Fettsäureoxidation (Garcia-Roves et al. 2007). Ist der Organismus über längere Zeiträume einer solchen Fettsäureanreicherung ausgesetzt, so kann dies letztendlich zu einem lipotoxischen Zustand führen (Listenberger et al. 2003). Palmitat bildet außerdem den Ausgangspunkt der de-novo-Synthese von Ceramiden (Wu et al. 2007). und induziert auf diesem Weg eine Apoptose der Zellen (Sparagna et al. 2000). Aber wie Wang et al. in kultivierten β -Inselzellen beobachteten, zeigte Palmitat hier eine aktivierende Wirkung auf die AMPK (Wang et al. 2007), was Sun et al. durch

chronische Palmitatbehandlung von Inselzellen widerlegten (Sun et al. 2008). Dies zeigt, dass neben der Konzentration auch die Dauer der Fettsäurebehandlung einen Einfluss auf den Metabolismus hat. Die aufgrund der HF-Diät nachweisbare Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von AMPK in der Leber (Abb. 4-26) ist, in Anbetracht der durchgeführten Zellversuche, vermutlich auf den hohen Anteil an Palmitat in der verabreichten Diät zurückzuführen.

Ein weiterer Aspekt ist zudem die Zusammensetzung und das Zusammenwirken verschiedener Fettsäuren. Wie Miller et al. bei der Behandlung von neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten, können geringe Konzentrationen von Oleat (100µM) Palmitat-induzierten oxidativen Stress inhibieren (Miller et al. 2005). Möglicherweise wird auch hier im Zellversuch die protektive Wirkung von Oleat deutlich. So zeigt die kombinierte Behandlung der Zellen mit den Fettsäuren Palmitat und Oleat in geringen Konzentrationen eine zunehmende Phosphorylierung und somit Aktivierung der AMPK (Abb. 4-35). Höhere Konzentrationen an Oleat im Medium dagegen wirken hemmend auf die Phosphorylierung (Abb. 4-31) und resultieren in einer Inaktivierung der Fettsäureoxidation und Anreicherung der Fettsäuren in den Zellen.

Einen gegenteiligen Effekt zeigt dagegen die Behandlung mit Docosahexaensäure (DHA), einer mehrfach ungesättigten (n-3) Fettsäure (PUFA) (Abb. 4-32). Hier sehen wir bei bereits 100 µM eine starke Aktivierung der AMPK, was durch Hemmung der ACC2 (Thomson and Winder 2009) zu einer gesteigerten Fettsäureoxidation führt. Die so gesteigerte Fettsäureoxidation wirkt protektiv und somit einer Lipidakkumulation und Lipotoxizität entgegen. Fütterungsversuche von Mäusen (Neschen et al. 2006) und Ratten (Duda et al. 2009) mit n-3 PUFA-Futterzusätzen zeigten eine Erhöhung der Adiponektin-Plasmaspiegel, was über Bindung an AdipoR1 zusätzlich eine Aktivierung der AMPK bewirken kann (Yamauchi et al. 2002). Aber wie bereits in Kapitel 5.1.4 beschrieben, können sowohl Adiponektin via AdipoR2 als auch n-3 PUFAs als aktivierende Liganden von PPARs fungieren (Yamauchi et al. 2014). Bereits 2009 beschrieben Duda et al. für n-3 PUFAs kardioprotektive Eigenschaften und Anderson et al. eine Reduktion an reaktiven Peroxiden in Mäusen (Anderson et al. 2009; Duda et al. 2009). N-3 PUFAs aktivieren PPAR α und induzieren so die Expression von Genen des Fettstoffwechsels (Clarke 2001). Der Transkriptionsinduktion von PPAR α folgt eine Komplexbildung mit PGC1 α . Dieser Komplex wirkt aktivierend auf NRF1 und führt somit zur Expressionsinduktion verschiedener mitochondrialer Gene und hat letztendlich einen positiven Effekt auf die mitochondriale Biogenese (Finck and Kelly 2007). Stanley et al. beschrieben mit dem Einbau von n-3 PUFAs, insbesondere DHA, in mitochondriale Membran-Phospholipide einen weiteren positiven Effekt, der sich

darin zeigt, dass Mitochondrien resistenter gegenüber Stressindikatoren wie Ca^{2+} sind (Stanley et al. 2012).

Abschließend betrachtet, bestätigen die Zellversuche die Wirkung der stark Palmitat-haltigen verabreichten Diät hinsichtlich der Deaktivierung der AMPK und machen zudem deutlich, dass bei den erzielten Ergebnissen sowohl die Dauer und Konzentration der Fettsäuren als auch die Fettsäurezusammensetzung einen entscheidenden und unterschiedlichen Einfluss auf den Metabolismus der Tiere hat.

5.3 Schlussfolgerung

Die Ursachen für die mit zunehmendem Alter unabhängig von Koronaren Herzerkrankungen (KHK), Klappenerkrankungen oder Myokarditiden auftretende Herzinsuffizienz sind vielfältig. Typische Folgeerscheinungen sind eine verzögerte diastolische Reaktion oder eine verminderte systolische Kontraktionskraft. Im Focus der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage nach einer vorzeitigen Induktion von kardialen Alterungsprozessen, aufgrund von Lipidüberschüssen in der Nahrung und somit im Metabolismus.

Abbildung 5-1 fasst die Ergebnisse ausgehend von der Arbeitstheorie des Circulus viciosus (Abb. 2-3) zusammen. Wie hier zu sehen ist, konnten wir einen Einfluss der fettreichen Diät auf verschiedensten Ebenen beobachten. Neben verstärkten Anzeichen von Alterung in Geweben der Tiere (z. B. Hypertrophie des LV), fanden wir Anzeichen von Lipotoxizität, Leptin- und Insulinresistenz im Organismus. Vor allem in der Gruppe der alten Tiere konnten wir diese Anzeichen am deutlichsten nachweisen. Basierend auf Untersuchungen der ventrikulären Funktion und Expressionsanalysen, deutet hier alles auf eine sich chronisch manifestierende Herzinsuffizienz hin. Im LV der jungen Tiere dagegen konnten nach Verabreichen der fettreichen Diät kaum Auswirkungen auf die kardiale Funktion nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür liegt einerseits in der Ausgangssituation des Gesamtstoffwechsels der Tiere, der in der Lage ist, sich an ein Überangebot von Fetten in der Nahrung zu adaptieren und so lipotoxische Auswirkungen zu vermindern. Aber auch die Fettsäurezusammensetzung der Diät kann hier eine zusätzliche Rolle einnehmen bis hin zu einem protektiven Effekt. Weiterführende Untersuchungen mit unterschiedlichen Diätzusammensetzungen und Versuchsdauer sollten hier weiteren Aufschluss geben.

6 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Einflüsse lipidreicher Diät hinsichtlich der Induktion von vorzeitigen Altersveränderungen im Myokard juveniler und seneszenten männlicher C57Bl/6-Mäuse.

Analysen der jungen Tiere zeigen eine geringe physiologische Reaktion der Tiere auf die lipidreiche Diät. Typische Alterungsvorgänge wie Hypertrophierung, Herzinsuffizienz oder Kollageneinlagerung können nicht nachgewiesen werden. Lediglich eine moderate Expressionsinduktion von BNP und eine Expressionsreduktion von Serca2 im LV lassen eine beginnende Herzinsuffizienz des Myokards, jedoch ohne funktionelle Beeinträchtigung, vermuten. Auch der nachgewiesene verminderte Gehalt an mtDNA sowie eine reduzierte Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe anhand der Citratsynthase im LV der Tiere lassen auf einen Funktionsverlust der Mitochondrien, der jedoch nicht zu einer schweren myokardialen Funktionseinschränkung führt, schließen. Zusätzlich deuten die Deaktivierung der AMPK und die hohen NEFA-Serumspiegel unter HF-Diät auf metabolische Veränderungen hingehend zu Insulinresistenz und Lipotoxizität hin. Deutlich stärker sehen wir dagegen eine Reaktion der alten Tiere auf die HF-Diät. So finden wir die vorliegende kardiale Hypertrophierung durch HF-Diät zusätzlich verstärkt. Gleichzeitig wird die Expression von ANP und BNP induziert und die Expression von Serca2 nach 14 Wochen Fütterung ist nachweislich deutlich reduziert. Zusammen mit der starken Kollageneinlagerung, einer verminderten E/A-Ratio sowie reduzierter Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe, kann man auf das Vorliegen einer kardialen Funktionseinschränkung aufgrund der verabreichten Diät schließen. In Anbetracht der stark erhöhten Insulinserumspiegel liegt hier ein prä-diabetischer Zustand vor oder in Verbindung mit dem hohen Leptinserumspiegel betrachtet, ein kardiometabolisches Syndrom. Die sowohl im Serum junger, als auch alter Tiere vorliegenden hohen NEFA-Spiegel lassen zudem einen zunehmend lipotoxischen Zustand der Tiere vermuten. Dieser ist vermutlich in einer Inaktivierung der AMPK (Abb. 4-26) und somit Reduktion der Fettsäureoxidation begründet. Zusammenfassend betrachtet, finden wir nur wenige Anzeichen der Induktion von vorzeitigen Alterungsvorgängen im juvenilen Myokard sowie geringe lipotoxische Reaktionen. Insgesamt scheint das junge Myokard in der Lage zu sein durch verschiedene Adaptationsvorgänge, wie gesteigerte Fettsäureoxidation oder mitochondriale Biogenese die hohe Lipidlast ohne Einschränkung der LV-Funktion zu überwinden. Das seneszente Myokard ist dazu nur begrenzt in der Lage. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung und der isolierten Wirkung einzelner Fettsäuren auf das kardiale Gewebe erscheinen sinnvoll.

7 Summary

Subject of the study was the impact of high fat diet on early signs of aging in myocard of young and old mice (C57Bl/6).

Analysis of young mice receiving a high fat diet showed a moderate physically reaction. We didn't observe typical signs of aging like hypertrophy, heart failure or increasing collagen content within the cardiac tissue. But a slight induction of BNP and a reduction of Serca 2 on RNA level indicate a beginning heart failure that doesn't result in functional impairment so far. Beside this a reduction in respiratory chain enzyme activity presumes mitochondrial loss of function but without a severe functional reduction of the myocard. Additional the inactivation of AMPK and high serum NEFA levels indicate metabolic changes leading to insulin resistance and lipotoxicity. In contrast the old mice show a more intense physiological reaction to the high fat diet. As a result we detected an increase in hypertrophied myocytes. On RNA level we found ANP and BNP induced and the expression of Serca 2 decreased significantly after 14 weeks of high fat diet feeding. Consistent with these results we observed increasing collagene integration in cardiac tissue, a decreased E/A ratio and reduced enzyme activity of respiratory chain complexes. Regarding the high serum insulin levels mice are prediabetic and in terms of the high leptin levels the animals show signs of cardiometabolic syndrome. High serum levels of NEFA show the increasing lipotoxic situation of the mice. This might caused by the deactivation of adiponectin followed by a reduction of fatty acid oxidation.

In conclusion in myocard of young mice we observed only slight indications of aging and minor lipotoxic reactions. This indicates the juvenile heart is able to tolerate a high impact of lipids in the metabolism by increasing fatty acid oxidation and without the development of left ventricular dysfunctions. In contrast the senescent myocard is limited in its reactions and not able to adapt to the high fat situation. Further research should focus on the impact of isolated fatty acids and the fatty acid composition on signs of aging in cardiac tissue.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoenzymA-Carboxylase
AcCoAOx / ACO	Acyl-CoA-Oxidase
Acot 1/ 2	Acyl-CoA-Thioesterasen 1 / 2
Acrp30	adipocyte complement-related protein of 30 kDa / Adiponektin
AdipoR1/AdipoR2	Adiponektin-Rezeptor 1/2
ADP/ATP	Adenosindi-/triphosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
AR1 / AR2	Adiponektin-Rezeptor 1 / 2
α AMPK	alpha-Untereinheit AMPK
pAMPK	phospho-AMPK (Thr 172)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BAEC	bovine aortic endothelial cells
bp	basepair/ Basenpaar
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CAT	Carboxyatractylat
cDNA	complementary DNA
CK	Kalorische Kontrolle
CoA	Coenzym A
COL 1/ 3	Kollagen Typ 1 / 3
CoQ	Coenzym Q
COX	Cytochrom c-Oxidase
CR	Kalorische Restriktion
CTRP	C1qTumor Necrosis Factor related Protein
CS	Citratsynthase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT-4	Glucose-Transporter 4
HD	Haltungsdiät
HEK	<u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells
HFD	High Fat Diät
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IL6	Interleukin 6
kcal	Kilocalorie
KHK	Koronare Herzerkrankung
LV	linker Ventrikel
MCAD	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg / µg	Milli- / Mikrogramm
min	Minute
ml / µl	Milli-/ Mikroliter
mM / µM	Milli- / Mikromol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NEFA	non-esterified fatty acids
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
NSCL2	neuronal stem cell leukemia (neuronaler bHLH Transkriptionsfaktor)
OCT	Einbettmedium für Kryoschnitte
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGC1 α	PPAR-Koaktivator, PPAR gamma coactivator-1alpha
PPAR	Peroxisome-proliferator-activated receptor-a
<i>red / ox</i>	reduziert / oxidiert
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel
SCD 1/ 4	Stearoyl-CoA-Desaturase 1 / 4

SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard error mean
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung + Tween
U	Unit
V	Volt
Vol	Volumen

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 2-1	Mitochondrien – Kraftwerke der Zelle	3
Abb. 2-2	Übersicht myokardialer Stoffwechsel	6
Abb. 2-3	Ciculus viciosus	15
Abb. 3-1	Klonierungsvektor – pcDNA 3.1 nV5	26
Abb. 3-2	Linksparasternale Längsachse; Messung im M-Mode	35
Abb. 3-3	schematische Darstellung der Dopplermessung des transmitralen Durchflusses	36
Abb. 4-1	ausgewählte Tiere der einzelnen Gruppen nach 16 Wochen Fütterung der fettreichen Diät	40
Abb. 4-2	zeitlicher Verlauf des Körpergewichtes der Gruppen HD und HF	41
Abb. 4-3	Vergleich der durchschnittlichen Endgewichte der einzelnen Gruppen	42
Abb. 4-4	OilRedO-Färbung von Fetteinlagerung im LV	45
Abb. 4-5	OilRedO-Färbung von Fetttröpfchen in Kardiomyozyten des linken Ventrikels	46
Abb. 4-6	Triglyceride und freie Fettsäuren im Serum	47
Abb. 4-7	Vergleich des Innendurchmessers des Linken Ventrikels (LVDd) und der Dicke des interventrikulären Septums (IVSd)	48
Abb. 4-8	Darstellung von Parametern der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion nach 14 Wochen Versuchsdauer	48
Abb. 4-9	Expressionsanalyse der Kollagen-kodierenden Gene COL1A1 und COL3A1 und Gesamtkollagengehalt	49
Abb. 4-10	Siriusrot-Färbung von Gewebeproben des linken Ventrikels	50
Abb. 4-11	ANP und BNP als Indikatoren für Herzinsuffizienz	51
Abb. 4-12	SERCA als Indikator für die Endphase chronischer Herzinsuffizienz	51
Abb. 4-13	cross sectional area	52
Abb. 4-14	Auswertung cross sectional area	53
Abb. 4-15	Expression von PPARAlpha und dessen Target Gene	55
Abb. 4-16	Expression von Acot1 und Acot2	56
Abb. 4-17	Expression von ACO und ACC2	57
Abb. 4-18	Aktivität und Expressionsanalyse von MCAD	58
Abb. 4-19	Expressionsanalyse der SCD-Isoformen SCD1 und SCD4	59
Abb. 4-20	Untersuchung der Serum-Konzentrationen	60
Abb. 4-21	Expressionsanalysen der Fettgewebshormone Adiponektin und Leptin im visceralen Fettgewebe nach 14 Wochen	61
Abb. 4-22	Expression der Adiponektin-Rezeptoren AR1, AR2 und tCadherin	61
Abb. 4-23	Expressionsanalyse der Adiponektin-Paralogen in verschiedenen Mausorganen	62

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 4-24	Expressionsanalyse der Adiponektin-Paralogen CTRP2 und CTRP7	63
Abb. 4-25	Expressionsanalysen der AMPK-Untereinheiten α 2AMPK, β 2AMPK, γ 2AMPK)	64
Abb. 4-26	Aktivität der AMPK u ACC in der Leber	65
Abb. 4-27	Expressionsanalyse von Genen der mitochondrialen Biogenese	66
Abb. 4-28	Expressionsanalysen im LV ausgewählter Proteine der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe	67
Abb. 4-29	Bestimmung der Expressionsmaxima von α 2AMPK in HEK293-Zellen	69
Abb. 4-30	Wirkung verschiedener Palmitatkonzentrationen auf die Phosphorylierung der AMPK untransfizierter Zellen	70
Abb. 4-31	Wirkung von steigenden Ölsäurekonzentrationen auf den Aktivitätszustand der AMPK untransfizierter Zellen	71
Abb. 4-32	repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Docosahexaensäure (DHA) auf den Aktivitätszustand der AMPK untransfizierter Zellen	73
Abb. 4-33	repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Palmitat auf den Aktivitätszustand der AMPK transfizierter Zellen	73
Abb. 4-34	repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Oleat auf den Aktivitätszustand der AMPK transfizierter Zellen	74
Abb. 4-35	repräsentativer Westernblot zur Wirkung von Oleat und Palmitat in Kombination auf den Aktivitätszustand der AMPK transfizierter Zellen	75
Abb. 5-1	Übersicht Ergebnisse – Einflüsse fettreicher Nahrung auf Metabolismus und Auswirkungen auf den Circulus Viciosus	94

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 3-1	Übersicht zu verwendeten Chemikalien allgemein	17
Tab. 3-2	Übersicht zu verwendeten Chemikalien in der Zellkultur	19
Tab. 3-3	Übersicht der verwendeten Fettsäuren für die Zellversuche	19
Tab. 3-4	Übersicht zu den verwendeten Molekularmarkern	19
Tab. 3-5	Übersicht zu verwendeten Enzymen	20
Tab. 3-6	Übersicht zu verwendeten Kits, Färbereagenzien sowie sonstiger Materialien	20
Tab. 3-7	Übersicht aller verwendeten Geräte	21
Tab. 3-8	Übersicht aller verwendeten Primer	24
Tab. 3-9	Übersicht zu verwendeten Vektoren zur Klonierung und Überexpression	26
Tab. 3-10	Übersicht zu verwendeten Sequenzierprimern	27
Tab. 3-11	Übersicht zu verwendeten Antikörpern für Western-Analysen mit Angabe der eingesetzten Konzentration	31
Tab. 3-12	verabreichte Diäten, Organentnahme, Histologie	33
Tab. 3-13	Übersicht zu verwendeten Zelllinien	38
Tab. 4-1	durchschnittliche Organgewichte nach 6 und 16 Wochen unter fettreicher Diät	43

11 Literaturverzeichnis

- Abel, E. D. (2007). "Glucose for the aging heart?" Circulation **116**(8): 884-7.
- Adam, T., et al. (2010). "AMPK activation represses the human gene promoter of the cardiac isoform of acetyl-CoA carboxylase: Role of nuclear respiratory factor-1." Biochem Biophys Res Commun **398**(3): 495-9.
- Akki, A. and A. M. Seymour (2009). "Western diet impairs metabolic remodelling and contractile efficiency in cardiac hypertrophy." Cardiovasc Res **81**(3): 610-7.
- Anderson, E. J., et al. (2012). "Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart." Clin Exp Pharmacol Physiol **39**(2): 179-93.
- Anderson, E. J., et al. (2009). "Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans." J Clin Invest **119**(3): 573-81.
- Aurich, A. C., et al. (2013). "Age-dependent effects of high fat-diet on murine left ventricles: role of palmitate." Basic Res Cardiol **108**(5): 369.
- Barger, P. M. and D. P. Kelly (2000). "PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism." Trends Cardiovasc Med **10**(6): 238-45.
- Barja, G. (2002). "Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction." Ageing Res Rev **1**(3): 397-411.
- Barja, G. and A. Herrero (2000). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals." Faseb J **14**(2): 312-8.
- Barnea, M., et al. (2006). "A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression." Obesity (Silver Spring) **14**(12): 2145-53.
- Barnes, K., et al. (2002). "Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK)." J Cell Sci **115**(Pt 11): 2433-42.
- Beauloye, C., et al. (2001). "Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides." FEBS Lett **505**(3): 348-52.
- Beylot, M., et al. (2006). "Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats." Metabolism **55**(3): 396-401.
- Biernacka, A. and N. G. Frangogiannis (2011). "Aging and Cardiac Fibrosis." Aging Dis **2**(2): 158-173.
- Bishop-Bailey, D. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system." Br J Pharmacol **129**(5): 823-34.
- Boffoli, D., et al. (1994). "Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle." Biochim Biophys Acta **1226**(1): 73-82.
- Bohr, V. A. (2002). "Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells." Free Radic Biol Med **32**(9): 804-12.
- Boudina, S., et al. (2005). "Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity." Circulation **112**(17): 2686-95.

- Boyle, A. J., et al. (2011). "Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy." Exp Gerontol **46**(7): 549-59.
- Brinkmann, J. F., et al. (2002). "New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36." Biochem J **367**(Pt 3): 561-70.
- Brunk, U. T., et al. (1992). "A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis." Mutat Res **275**(3-6): 395-403.
- Bundy, J. G., et al. (2008). "'Systems toxicology' approach identifies coordinated metabolic responses to copper in a terrestrial non-model invertebrate, the earthworm *Lumbricus rubellus*." BMC Biol **6**: 25.
- Burgoyne, J. R., et al. (2012). "Redox signaling in cardiac physiology and pathology." Circ Res **111**(8): 1091-106.
- Byrne, J. A., et al. (2003). "Oxidative stress and heart failure." Arch Mal Coeur Vaiss **96**(3): 214-21.
- Cartee, G. D. (1993). "Myocardial GLUT-4 glucose transporter protein levels of rats decline with advancing age." J Gerontol **48**(4): B168-70.
- Chandler, M. P., et al. (2007). "Heart failure progression is accelerated following myocardial infarction in type 2 diabetic rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1609-16.
- Chiamvimonvat, N. (2002). "Diastolic dysfunction and the aging heart." J Mol Cell Cardiol **34**(6): 607-10.
- Chiu, H. C., et al. (2001). "A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy." J Clin Invest **107**(7): 813-22.
- Choi, C. S., et al. (2007). "Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance." J Clin Invest **117**(7): 1995-2003.
- Christoffersen, C., et al. (2003). "Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice." Endocrinology **144**(8): 3483-90.
- Clarke, S. D. (2001). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome." J Nutr **131**(4): 1129-32.
- Cohen, P., et al. (2002). "Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss." Science **297**(5579): 240-3.
- Cole, M. A., et al. (2011). "A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart." Basic Res Cardiol **106**(3): 447-57.
- Daval, M., et al. (2005). "Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes." J Biol Chem **280**(26): 25250-7.
- de Boer, R. A., et al. (2001). "Early expression of natriuretic peptides and SERCA in mild heart failure: association with severity of the disease." Int J Cardiol **78**(1): 5-12.
- de Jong, S., et al. (2012). "Monitoring cardiac fibrosis: a technical challenge." Neth Heart J **20**(1): 44-8.
- de Souza, R. R. (2002). "Aging of myocardial collagen." Biogerontology **3**(6): 325-35.

- Delarue, J. and C. Magnan (2007). "Free fatty acids and insulin resistance." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(2): 142-8.
- Denzel, M. S., et al. (2010). "T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice." J Clin Invest **120**(12): 4342-52.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-88.
- Dewald, O., et al. (2005). "Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species and prevents lipotoxicity." Circulation **112**(3): 407-15.
- Dietschy, J. M. (1998). "Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations." J Nutr **128**(2 Suppl): 444S-448S.
- Dirkx, E., et al. (2011). "High fat diet induced diabetic cardiomyopathy." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **85**(5): 219-25.
- Duda, M. K., et al. (2009). "omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for the treatment of heart failure: mechanisms and clinical potential." Cardiovasc Res **84**(1): 33-41.
- Duncan, J. G., et al. (2007). "Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway." Circulation **115**(7): 909-17.
- Dyck, J. R. and G. D. Lopaschuk (2002). "Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart." J Mol Cell Cardiol **34**(9): 1099-109.
- Eckel, R. H., et al. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet **365**(9468): 1415-28.
- Ferrari, R., et al. (2009). "Mechanisms of remodelling: a question of life (stem cell production) and death (myocyte apoptosis)." Circ J **73**(11): 1973-82.
- Finck, B. N., et al. (2003). "A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1226-31.
- Finck, B. N. and D. P. Kelly (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart." J Mol Cell Cardiol **34**(10): 1249-57.
- Finck, B. N. and D. P. Kelly (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease." Circulation **115**(19): 2540-8.
- Flowers, M. T. and J. M. Ntambi (2008). "Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism." Curr Opin Lipidol **19**(3): 248-56.
- Folmes, C. D. and G. D. Lopaschuk (2007). "Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity." Cardiovasc Res **73**(2): 278-87.
- Garcia-Roves, P., et al. (2007). "Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10709-13.
- Gates, P. E., et al. (2003). "Left ventricular structure and diastolic function with human ageing. Relation to habitual exercise and arterial stiffness." Eur Heart J **24**(24): 2213-20.

- Gilde, A. J., et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism." Circ Res **92**(5): 518-24.
- Giulivi, C., et al. (1998). "Production of nitric oxide by mitochondria." J Biol Chem **273**(18): 11038-43.
- Goglia, F. and V. P. Skulachev (2003). "A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet." Faseb J **17**(12): 1585-91.
- Goldstein, B. J., et al. (2009). "Protective vascular and myocardial effects of adiponectin." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **6**(1): 27-35.
- Grimsgaard, S., et al. (1997). "Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids." Am J Clin Nutr **66**(3): 649-59.
- Hagen, T. M., et al. (2002). "Mitochondrial decay in the aging rat heart: evidence for improvement by dietary supplementation with acetyl-L-carnitine and/or lipoic acid." Ann N Y Acad Sci **959**: 491-507.
- Hamrick, M. W., et al. (2006). "Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin." Bone **39**(4): 845-53.
- Hardie, D. G., et al. (2006). "AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept." J Physiol **574**(Pt 1): 7-15.
- Hardy, C. J., et al. (1991). "Altered myocardial high-energy phosphate metabolites in patients with dilated cardiomyopathy." Am Heart J **122**(3 Pt 1): 795-801.
- Hardy, S., et al. (2003). "Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin." J Biol Chem **278**(34): 31861-70.
- Hasenfuss, G., et al. (1994). "Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium." Circ Res **75**(3): 434-42.
- Hebert, S. L., et al. (2010). "Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging." Mech Ageing Dev **131**(7-8): 451-62.
- Hecker, P. A., et al. (2011). "Role of adiponectin in the development of high fat diet-induced metabolic abnormalities in mice." Horm Metab Res **43**(2): 100-5.
- Hepple, R. T., et al. (2006). "Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles." Rejuvenation Res **9**(2): 219-22.
- Ho, J. K., et al. (2002). "Interactions of acyl carnitines with model membranes: a (13)C-NMR study." J Lipid Res **43**(9): 1429-39.
- Hoeks, J., et al. (2006). "Involvement of UCP3 in mild uncoupling and lipotoxicity." Exp Gerontol **41**(7): 658-62.
- Hopkins, T. A., et al. (2003). "Control of cardiac pyruvate dehydrogenase activity in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(1): H270-6.
- Hotta, K., et al. (2000). "Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(6): 1595-9.

- Hotta, K., et al. (2001). "Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys." Diabetes **50**(5): 1126-33.
- Hou, N. and J. D. Luo (2011). "Leptin and cardiovascular diseases." Clin Exp Pharmacol Physiol **38**(12): 905-13.
- Hue, L. and H. Taegtmeyer (2009). "The Randle cycle revisited: a new head for an old hat." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(3): E578-91.
- Huss, J. M. and D. P. Kelly (2004). "Nuclear receptor signaling and cardiac energetics." Circ Res **95**(6): 568-78.
- Huss, J. M. and D. P. Kelly (2005). "Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance." J Clin Invest **115**(3): 547-55.
- Iwabu, M., et al. (2010). "Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1." Nature **464**(7293): 1313-9.
- Jackson, C. F. and N. K. Wenger (2011). "Cardiovascular disease in the elderly." Rev Esp Cardiol **64**(8): 697-712.
- Judge, S. and C. Leeuwenburgh (2007). "Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging." Am J Physiol Cell Physiol **292**(6): C1983-92.
- Kahn, B. B., et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." Cell Metab **1**(1): 15-25.
- Karavidas, A., et al. (2010). "Aging and the cardiovascular system." Hellenic J Cardiol **51**(5): 421-7.
- Kates, A. M., et al. (2003). "Impact of aging on substrate metabolism by the human heart." J Am Coll Cardiol **41**(2): 293-9.
- Kotronen, A., et al. (2008). "Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome." Diabetologia **51**(1): 130-8.
- Kovacic, S., et al. (2003). "Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart." J Biol Chem **278**(41): 39422-7.
- Kratz, M. (2005). "Dietary cholesterol, atherosclerosis and coronary heart disease." Handb Exp Pharmacol(170): 195-213.
- Krishnan, K. J., et al. (2007). "Mitochondrial DNA mutations and aging." Ann N Y Acad Sci **1100**: 227-40.
- Kuller, L. H. (2006). "Nutrition, lipids, and cardiovascular disease." Nutr Rev **64**(2 Pt 2): S15-26.
- Kumaran, S., et al. (2004). "Age-associated decreased activities of mitochondrial electron transport chain complexes in heart and skeletal muscle: role of L-carnitine." Chem Biol Interact **148**(1-2): 11-8.
- Kwak, H. B. (2013). "Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart." J Exerc Rehabil **9**(3): 338-47.
- Lakatta, E. G. (1990). "Changes in cardiovascular function with aging." Eur Heart J **11 Suppl C**: 22-9.

- Lakatta, E. G. and S. J. Sollott (2002). "Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **132**(4): 699-721.
- Lane, M. D., et al. (2008). "Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA." Int J Obes (Lond) **32 Suppl 4**: S49-54.
- Lecarpentier, Y., et al. (2010). "PPARs, Cardiovascular Metabolism, and Function: Near- or Far-from-Equilibrium Pathways." PPAR Res **2010**.
- Lehman, T. C., et al. (1990). "An acyl-coenzyme A dehydrogenase assay utilizing the ferricenium ion." Anal Biochem **186**(2): 280-4.
- Lehmann, S., et al. (2000). "Cardiac systolic function before and after hematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **26**(2): 187-92.
- Lenaz, G., et al. (2002). "Role of mitochondria in oxidative stress and aging." Ann N Y Acad Sci **959**: 199-213.
- Lionetti, V., et al. (2011). "Modulating fatty acid oxidation in heart failure." Cardiovasc Res **90**(2): 202-9.
- Listenberger, L. L., et al. (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3077-82.
- Listenberger, L. L., et al. (2001). "Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway." J Biol Chem **276**(18): 14890-5.
- Long, Y. C. and J. R. Zierath (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." J Clin Invest **116**(7): 1776-83.
- Longo, V. D. (2004). "Ras: the other pro-aging pathway." Sci Aging Knowledge Environ **2004**(39): pe36.
- Lopaschuk, G. D., et al. (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." Physiol Rev **90**(1): 207-58.
- Lopez-Lluch, G., et al. (2008). "Mitochondrial biogenesis and healthy aging." Exp Gerontol **43**(9): 813-9.
- Lorenzo, O., et al. (2013). "Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy." Mediators Inflamm **2013**: 461967.
- Lygate, C. A., et al. (2007). "The creatine kinase energy transport system in the failing mouse heart." J Mol Cell Cardiol **42**(6): 1129-36.
- Mair, J., et al. (2001). "The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure." Clin Chem Lab Med **39**(7): 571-88.
- Manczak, M., et al. (2005). "Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging." J Neurochem **92**(3): 494-504.
- Marwick, T. H. (2008). "Diabetic heart disease." Postgrad Med J **84**(990): 188-92.
- Matsui, H., et al. (2012). "Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inhibits apoptosis in cardiac myocytes." PLoS One **7**(3): e33283.
- McMillin, J. B., et al. (1993). "Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart." Cardiovasc Res **27**(12): 2222-8.

- McMurray, J. J., et al. (2012). "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC." Eur J Heart Fail **14**(8): 803-69.
- Meissner, C. (2007). "Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process?" Z Gerontol Geriatr **40**(5): 325-33.
- Menotti, A., et al. (2006). "The relationship of age, blood pressure, serum cholesterol and smoking habits with the risk of typical and atypical coronary heart disease death in the European cohorts of the Seven Countries Study." Int J Cardiol **106**(2): 157-63.
- Miller, T. A., et al. (2005). "Oleate prevents palmitate-induced cytotoxic stress in cardiac myocytes." Biochem Biophys Res Commun **336**(1): 309-15.
- Mills, E., et al. (1993). "Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus." Am J Physiol **264**(1 Pt 2): R73-8.
- Minokoshi, Y. and B. B. Kahn (2003). "Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 196-201.
- Minokoshi, Y., et al. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-43.
- Minokoshi, Y., et al. (2012). "Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle." Indian J Endocrinol Metab **16**(Suppl 3): S562-8.
- Miwa, S. and M. D. Brand (2003). "Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1300-1.
- Miyazaki, M., et al. (2003). "Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors." J Biol Chem **278**(36): 33904-11.
- Miyazaki, M. and J. M. Ntambi (2003). "Role of stearyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **68**(2): 113-21.
- Mootha, V. K., et al. (2003). "PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes." Nat Genet **34**(3): 267-73.
- Morgan, E. E., et al. (2006). "Effects of chronic activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha or high-fat feeding in a rat infarct model of heart failure." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(5): H1899-904.
- Morita, E., et al. (1993). "Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction." Circulation **88**(1): 82-91.
- Murray, A. J., et al. (2007). "Mitochondria and heart failure." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(6): 704-11.
- Murray, A. J., et al. (2005). "Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of myocardial uncoupling protein levels." Diabetes **54**(12): 3496-502.
- Najjar, S. S., et al. (2005). "Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor?" Hypertension **46**(3): 454-62.

- Navarro, A. and A. Boveris (2007). "The mitochondrial energy transduction system and the aging process." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C670-86.
- Neschen, S., et al. (2006). "Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice." Diabetes **55**(4): 924-8.
- Neubauer, S., et al. (1995). "Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction." J Clin Invest **95**(3): 1092-100.
- Nguyen, Q. T., et al. (2001). "Construction of a two-photon microscope for video-rate Ca(2+) imaging." Cell Calcium **30**(6): 383-93.
- Nicholson, T., et al. (2013). "The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review." Food Funct **4**(3): 357-65.
- Nisoli, E., et al. (2004). "Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework." Biochem Pharmacol **67**(1): 1-15.
- Nisoli, E., et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide." Science **299**(5608): 896-9.
- Nisoli, E., et al. (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." Science **310**(5746): 314-7.
- Ntambi, J. M. (1999). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol." J Lipid Res **40**(9): 1549-58.
- Odiet, J. A., et al. (1995). "Carnitine palmitoyl transferase-I activity in the aging mouse heart." Mech Ageing Dev **79**(2-3): 127-36.
- Okere, I. C., et al. (2007). "Carnitine palmitoyl transferase-I inhibition is not associated with cardiac hypertrophy in rats fed a high-fat diet." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(1-2): 113-9.
- Okere, I. C., et al. (2006). "Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(1): H38-44.
- Olivetti, G., et al. (1991). "Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy." Circ Res **68**(6): 1560-8.
- Ozaki, N., et al. (1996). "Early changes in the expression of GLUT4 protein in the heart of senescence-accelerated mouse." Mech Ageing Dev **88**(3): 149-58.
- Palazzuoli, A., et al. (2010). "Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure." Vasc Health Risk Manag **6**: 411-8.
- Panagia, M., et al. (2005). "PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(6): H2677-83.
- Park, S. H., et al. (2002). "Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle." J Appl Physiol **92**(6): 2475-82.
- Patel, M. S. and L. G. Korotchkina (2006). "Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex." Biochem Soc Trans **34**(Pt 2): 217-22.

- Patti, M. E., et al. (2003). "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8466-71.
- Peter, A., et al. (2009). "Individual stearyl-coa desaturase 1 expression modulates endoplasmic reticulum stress and inflammation in human myotubes and is associated with skeletal muscle lipid storage and insulin sensitivity in vivo." Diabetes **58**(8): 1757-65.
- Petersen, K. F. and G. I. Shulman (2006). "Etiology of insulin resistance." Am J Med **119**(5 Suppl 1): S10-6.
- Peterson, J. M., et al. (2013). "CTRP3 attenuates diet-induced hepatic steatosis by regulating triglyceride metabolism." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **305**(3): G214-24.
- Rasmussen, B. B., et al. (2002). "Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle." J Clin Invest **110**(11): 1687-93.
- Rennison, J. H., et al. (2008). "Enhanced acyl-CoA dehydrogenase activity is associated with improved mitochondrial and contractile function in heart failure." Cardiovasc Res **79**(2): 331-40.
- Rennison, J. H., et al. (2007). "High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(3): H1498-506.
- Richter, C., et al. (1997). "Nitric oxide and mitochondrial Ca²⁺." Biochem Soc Trans **25**(3): 914-8.
- Rijzewijk, L. J., et al. (2008). "Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus." J Am Coll Cardiol **52**(22): 1793-9.
- Rodgers, J. T., et al. (2005). "Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1." Nature **434**(7029): 113-8.
- Rohrbach, S. (2009). "Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria." Curr Pharm Des **15**(36): 4103-16.
- Rohrbach, S., et al. (2007). "Age-associated loss in adiponectin-activation by caloric restriction: lack of compensation by enhanced inducibility of adiponectin paralogs CTRP2 and CTRP7." Mol Cell Endocrinol **277**(1-2): 26-34.
- Rohrbach, S., et al. (2006). "Caloric restriction and mitochondrial function in the ageing myocardium." Exp Gerontol **41**(5): 525-31.
- Rosca, M. G. and C. L. Hoppel (2010). "Mitochondria in heart failure." Cardiovasc Res **88**(1): 40-50.
- Sadek, H., Nulton-Persson, AC, Szweda, PA, Szweda, LI (2003). "Cardiac ischemia/reperfusion, aging, and redox-dependent alterations in mitochondrial function." Arch Biochem Biophys **420**(2): 201-8.
- Saks, V., et al. (2006). "Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands." J Physiol **577**(Pt 3): 769-77.
- Scarpulla, R. C. (2002). "Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells." Gene **286**(1): 81-9.
- Schaffer, J. E. (2003). "Lipotoxicity: when tissues overeat." Curr Opin Lipidol **14**(3): 281-7.

- Schrauwen, P. and M. Hesselink (2003). "Uncoupling protein 3 and physical activity: the role of uncoupling protein 3 in energy metabolism revisited." Proc Nutr Soc **62**(3): 635-43.
- Schrauwen, P., et al. (2001). "An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix." Faseb J **15**(13): 2497-502.
- Schupp, M., et al. (2006). "Cardiac PPARalpha expression in patients with dilated cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **8**(3): 290-4.
- Seldin, M. M., et al. (2012). "Skeletal muscle-derived myonectin activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway to suppress autophagy in liver." J Biol Chem **288**(50): 36073-82.
- Seldin, M. M., et al. (2013). "Metabolic function of the CTRP family of hormones." Rev Endocr Metab Disord.
- Sharma, S., et al. (2004). "Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart." Faseb J **18**(14): 1692-700.
- Shibata, R., et al. (2004). "Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart." Nat Med **10**(12): 1384-9.
- Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 171-6.
- Simkhovich, B. Z., et al. (2003). "Age-related changes of cardiac gene expression following myocardial ischemia/reperfusion." Arch Biochem Biophys **420**(2): 268-78.
- Sparagna, G. C., et al. (2000). "A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(5): H2124-32.
- Stanley, W. C., et al. (2012). "Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **15**(2): 122-6.
- Stanley, W. C., et al. (2005). "Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart." Physiol Rev **85**(3): 1093-129.
- Stavinoha, M. A., et al. (2004). "Evidence for mitochondrial thioesterase 1 as a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-regulated gene in cardiac and skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **287**(5): E888-95.
- Strait, J. B. and E. G. Lakatta (2012). "Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure." Heart Fail Clin **8**(1): 143-64.
- Sun, Y., et al. (2008). "Chronic palmitate exposure inhibits AMPKalpha and decreases glucose-stimulated insulin secretion from beta-cells: modulation by fenofibrate." Acta Pharmacol Sin **29**(4): 443-50.
- Surwit, R. S., et al. (1995). "Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice." Metabolism **44**(5): 645-51.
- Surwit, R. S., et al. (1988). "Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice." Diabetes **37**(9): 1163-7.
- Szczepaniak, L. S., et al. (2003). "Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging." Magn Reson Med **49**(3): 417-23.

- Takahashi, R. and S. Goto (2002). "Effect of dietary restriction beyond middle age: accumulation of altered proteins and protein degradation." Microsc Res Tech **59**(4): 278-81.
- Thomson, D. M. and W. W. Winder (2009). "AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle." Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 147-54.
- Tsutsui, H. (2006). "Mitochondrial oxidative stress and heart failure." Intern Med **45**(13): 809-13.
- Tsutsui, H., et al. (2011). "Oxidative stress and heart failure." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(6): H2181-90.
- Turdi, S., et al. (2011). "Deficiency in AMP-activated protein kinase exaggerates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction." J Mol Cell Cardiol **50**(4): 712-22.
- Unger, R. H. and L. Orci (2001). "Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders." Faseb J **15**(2): 312-21.
- van Herpen, N. A. and V. B. Schrauwen-Hinderling (2008). "Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity." Physiol Behav **94**(2): 231-41.
- Varagic, J., et al. (2001). "Heart, aging, and hypertension." Curr Opin Cardiol **16**(6): 336-41.
- Videla, L. A., et al. (2004). "Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease." Free Radic Biol Med **37**(9): 1499-507.
- Vikramadithyan, R. K., et al. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate heart function in transgenic mice with lipotoxic cardiomyopathy." J Pharmacol Exp Ther **313**(2): 586-93.
- Waki, H., et al. (2003). "Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin." J Biol Chem **278**(41): 40352-63.
- Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." Annu Rev Genet **39**: 359-407.
- Walsh, M. E., et al. (2014). "The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents." Free Radic Biol Med **66**: 88-99.
- Wang, X., et al. (2007). "Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells." Biochem Biophys Res Commun **352**(2): 463-8.
- Wei, Z., et al. (2012). "C1q/TNF-related protein-12 (CTRP12), a novel adipokine that improves insulin sensitivity and glycemic control in mouse models of obesity and diabetes." J Biol Chem **287**(13): 10301-15.
- Wessells, R. J. and R. Bodmer (2007). "Cardiac aging." Semin Cell Dev Biol **18**(1): 111-6.
- Wilson, C. R., et al. (2007). "Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats." Biochem J **406**(3): 457-67.
- Winzell, M. S. and B. Ahren (2004). "The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes." Diabetes **53 Suppl 3**: S215-9.

- Wong, G. W., et al. (2008). "Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions." Biochem J **416**(2): 161-77.
- Wong, G. W., et al. (2004). "A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10302-7.
- Wong, L. S., et al. (2010). "Aging, telomeres and heart failure." Heart Fail Rev **15**(5): 479-86.
- Woods, A., et al. (2000). "Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase." Mol Cell Biol **20**(18): 6704-11.
- Wu, D., et al. (2013). "Diet-induced obesity has a differential effect on adipose tissue and macrophage inflammatory responses of young and old mice." Biofactors.
- Wu, Y., et al. (2007). "Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **282**(13): 9777-88.
- Wu, Z., et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-24.
- Yamauchi, T., et al. (2014). "Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **28**(1): 15-23.
- Yamauchi, T., et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med **8**(11): 1288-95.
- Yanni, J., et al. (2010). "Structural remodelling of the sinoatrial node in obese old rats." J Mol Cell Cardiol **48**(4): 653-62.
- Yao, H., et al. (2005). "Gene expression of adiponectin and adiponectin receptor 1 in type 2 diabetic rats and the relationship with the parameters of glucose and lipid metabolism." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **25**(3): 285-8.
- Yarnell, J., et al. (2003). "Family history, longevity, and risk of coronary heart disease: the PRIME Study." Int J Epidemiol **32**(1): 71-7.
- Young, L. H., et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart." Trends Cardiovasc Med **15**(3): 110-8.
- Young, M. E., et al. (2001). "Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart." Faseb J **15**(3): 833-45.
- Zheng, D., et al. (2001). "Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase." J Appl Physiol **91**(3): 1073-83.
- Zheng, Y., et al. (2001). "Scd3--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin." Genomics **71**(2): 182-91.
- Zhou, Y. and L. Rui (2013). "Leptin signaling and leptin resistance." Front Med **7**(2): 207-22.
- Zhou, Y. T., et al. (2000). "Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1784-9.

12 Anhang

12.1 Diäten

12.1.1 Low Fat Diät und High Fat Diät

	D12450B	D12451
	Low Fat Diet	High Fat Diet
Lard	20.0	177.5
Soybean Oil	25.0	25.0
C2, Acetic	0.0	0.0
C4, Butyric	0.0	0.0
C6, Caproic	0.0	0.0
C8, Caprylic	0.0	0.0
C10, Capric	0.0	0.0
C12, Lauric	0.0	0.0
C14, Myristic	0.2	1.6
C14:1, Myristoleic	0.1	0.9
C16, Palmitic	7.2	43.2
C16:1, Palmitoleic	0.8	6.7
C18, Stearic	3.6	24.6
C18:1, Oleic	14.3	79.0
C18:2, Linoleic	15.1	28.6
C18:3, Linolenic	2.2	3.7
C18:4	0.0	0.0
C20, Arachidic	0.0	0.0
C20:1	0.0	0.0
C20:4, Arachidonic	0.3	3.0
C20:5	0.0	0.0
C22, Behenic	0.0	0.0
C22:1, Erucic	0.0	0.0
C22:4, Clupanodonic	0.0	0.0
C22:5	0.0	0.0
C22:6	0.0	0.0
C24, Lignoceric	0.0	0.0
Total (g)	43.7	191.4
Saturated (g)	11.0	69.4
Monounsaturated (g)	15.2	86.7
Polyunsaturated (g)	17.6	35.4
Saturated (%)	25.1	36.3
Monounsaturated (%)	34.7	45.3
Polyunsaturated (%)	40.2	18.5

Abbildung 8-1 Zusammensetzung der Diäten

Low Fat Diet D12450B (10 kcal%; 4057 kcal/kg) / High Fat Diät D12451 (45 kcal%; 4730 kcal/kg) [Quelle Research Diets Inc, web page]

12.1.2 Kontroll-Diät

HALTUNGSDIÄT – RATTEN UND MÄUSE **MAINTENANCE DIET – RATS AND MICE**

1320**Rohnährstoffe | Crude Nutrients [%]**

Trockensubstanz Dry Matter	89.0
Rohprotein Crude Protein	19.0
Rohfett Crude Fat	4.0
Rohfaser Crude Fibre	6.0
Rohasche Crude Ash	7.0
NfE Stickstoff freie Extraktstoffe Nitrogen Free Extracts	53.0

Mineralstoffe | Minerals [%]

Calcium	0.9
Phosphor Phosphorus	0.7
Magnesium	0.3
Natrium Sodium	0.2
Kalium Potassium	1.0

Umsetzbare Energie | Metabolizable Energy

11.9 MJ/kg (2844 kcal/kg)

Kalorien aus Protein | Calories from protein*

24 %

Kalorien aus Fett | Calories from fat*

11 %

Kalorien aus Kohlenhydraten | Calories from carbohydrates*

65 %

(* berechnet mittels Atwater Faktoren | calculated using Atwater factors)

Aminosäuren | Amino Acids [%]

Alanin Alanine	0.9
Arginin Arginine	1.2
Asparaginsäure Aspartic Acid	1.8
Glutaminsäure Glutamic Acid	3.8
Glycin Glycine	0.9
Histidin Histidine	0.4
Isoleucin Isoleucine	0.8
Leucin Leucine	1.4
Lysin Lysine	0.9
Met + Cyst	0.6
Phenylalanin Phenylalanine	0.8
Phe + Tyr	1.4
Prolin Proline	1.2
Serin Serine	0.9
Threonin Threonine	0.7
Tryptophan	0.2
Valin Valine	0.9

Vitamine pro kg | Vitamins per kg

	Standard	Fortified
Vitamin A	15.000 IE IU	25.000 IE IU
Vitamin D3	600 IE IU	1.000 IE IU
Vitamin B1	18 mg	30 mg
Vitamin B2	12 mg	20 mg
Vitamin B6	9 mg	15 mg
Vitamin B12	24 mcg	40 mcg
Vitamin C	36 mg	58 mg
Vitamin K3	3 mg	5 mg
Vitamin E	75 mg	125 mg
Folsäure Folic Acid	2 mg	3 mg
Biotin	60 mcg	100 mcg
Nikotinsäure Nicotinic Acid	36 mg	60 mg
Pantothensäure Pantothenic Acid	21 mg	35 mg
Cholinchlorid Choline Chloride	600 mg	1.000 mg

Spurenelemente | Trace Elements [ppm]

Eisen Iron	165
Mangan Manganese	75
Zink Zinc	70
Kupfer Copper	13
Iod Iodine	1.5
Selen Selenium	0.6
Kobalt Cobalt	0.3

Altromin Produkte | Products

1321	Mehlform Meal, fine-grained
1324	Pellets, 10 mm
1326	Pellets, 13 mm
1329	Extrudate Extrudates
132x N	Nitrosaminarm Deficient in Nitrosamines
Fortified	Autoklavierbar Autoclavable

Abbildung 8-2 Zusammensetzung der HD-Diät 1320 [Quelle altromin, web page] 11 kcal%;
modifiziert auf 2500 kcal/kg

12.2 Publikationen

Aurich AC, Niemann B, Pan R, Gruenler S, Issa H, Silber RE, Rohrbach S
Age dependent effects of high fat-diet on murine left ventricles: role of palmitate
Basic Res Cardiol 2013 Sep 108(5):369. Epub 2013 Jul 9.

Li L, Pan R, Li R, Niemann B, **Aurich AC**, Chen Y, Rohrbach S
Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required.
Diabetes. 2011 Jan;60(1):157-67. Epub 2010 Oct 7.

Rohrbach S, **Aurich AC**, Li L, Niemann B
Age-associated loss in Adiponektin -activation by caloric restriction: lack of compensation by enhanced inducibility of Adiponektin paralogs CTRP2 and CTRP7.
Mol Cell Endocrinol. 2007 Oct 15;277(1-2):26-34. Epub 2007 Jul 19.

12.3 Abstract

Aurich AC, Niemann B, Li L, Gruenler S, Chen Y, Issa H, Rohrbach S
High Fat Diät bewirkt Zeichen vorzeitiger kardialer Alterung sowie Aktivitätsverlust der AMP-aktivierten Proteinkinase im Maus LV
DGK Mannheim 2009 / V638

12.4 Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Susanne Rohrbach für die Vergabe dieses interessanten Themas und ihre maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beitragende exzellenten Betreuung sowohl in experimentellen Fragen als auch für ihre hilfreichen Hinweise beim Interpretieren der Daten und Schreiben der vorliegenden Arbeit. Herrn Prof. Jürgen Holtz danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung der Arbeit am Institut für Pathophysiologie und für seine Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Bernd Niemann für seine Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der echokardiographischen Untersuchung der Tiere sowie die hilfreichen Ratschläge zum Umgang mit Versuchstieren.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Regina Gall und Frau Beate Heinze danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor. Frau Dr. Chen Ying und Frau Dr. Li Ling danke ich für die enge Zusammenarbeit bei der Ausführung der Mikrorespirometrie. Frau Dr. Pan Ruping danke ich insbesondere für die Unterstützung bei der Durchführung von mikroskopischen Färbungen. Meiner Kollegin Frau Stefanie Grünler danke ich für die gute Zusammenarbeit und Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Fütterungsversuche. Mein Dank gilt ebenso Herrn Roland Busath für seine Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der Diagramme und statistischen Auswertungen. Weiterhin danke ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe Pathophysiologie für die nette und herzliche Atmosphäre im Labor, die mich auf dem Weg zur Erstellung dieser Dissertation begleitet hat.

Herrn Dr. H. Issah danke ich für die Durchführung der echokardiographischen Datenerfassung und der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Hansen danke ich für die Nutzung des Mikroskopes und der zugehörigen Software zur Auswertung der Daten.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre unablässige Unterstützung. Durch ihre Hilfe, ihr Verständnis und geduldige Begleitung durch Höhen und Tiefen haben sie maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Danke!